Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus des Mutagens 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Roland Süßmuth
aus Mittelsteine / Niederschlesien

1969

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0015

Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus des Mutagens 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Roland Süßmuth

aus Mittelsteine / Niederschlesien

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 1968

Dekan: Prof. Dr. H. Blume

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lingens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von

Herrn Professor Dr. F. Lingens

im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Lingens möchte ich sehr herzlich für die Förderung, die vielen wertvollen Anregungen und die mir gewährte freie Entfaltungsmöglichkeit danken.

Dem Direktor des Chemischen Instituts,

Herrn Professor Dr. E. Müller,

danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Ein Teil der Arbeit wurde im Zusammenwirken mit dem Institut für Therapeutische Biochemie, Frankfurt/Main, unter der Leitung des Herrn Professor Dr. A. Wacker angefertigt. Ihm und besonders Herrn Dr. P. Chandra möchte ich für Hilfe herzlich danken.

Ebenso danke ich Fräulein R. Mätzelt für Hilfe, besonders beim Mutantentest.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Mutation und Mutationsauslösung durch Chemikalien 1

Theoretischer Teil

1. Eigenschaften von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) und Wirkungen auf die Zelle 5
1.1. Eigenschaften des NNMG 5
1.1.1. Reaktionen des NNMG nach McKay 5
1.1.2. Strukturformel und UV-Spektrum 6
1.1.3. Toxische und allergische Wirkungen 7
1.1.4. Cancerogen und Cytostatikum 7
1.1.5. Mutationsauslösung bei verschiedenen Organismen 7
1.2. Die Problematik der mutagenen Wirkung bei NNMG 8
1.3. Untersuchungen der Wirkungen des NNMG auf die lebende Zelle 9
1.3.1. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme bei E. coli als Funktion der Zeit 9
1.3.2. Die Stabilität des NNMG als Funktion des p_H-Wertes 11
1.3.3. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli 12
1.3.4. Wachstum von E. coli-Populationen unter NNMG-Zusatz und deren NNMG-Aufnahme bei verschiedenen p_H-Werten 15
1.3.5. NNMG-Aufnahme und Mutationsrate bei S. cerevisiae in Abhängigkeit vom p_H-Wert 17
2. Modellversuche in vitro an NNMG-behandelten Nucleinsäuren mit Protein- und RNS-Synthese-systemen 19
2.1. Untersuchungen mit Hilfe der Proteinbiosynthese 19
2.1.1. Die Ribonucleinsäuren und der genetische Code 20
2.1.2. Die einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese 23
2.1.3. Untersuchungen NNMG-behandelter Ribonuclein-säuren mit dem Einbausystem von Nirenberg und Matthaei 26

2.1.4.	Einwirkungen von NNMG auf die Transfer- und Akzeptoraktivität	30
2.2.	Prüfung der durch NNMG veränderten DNS mit dem RNS-Polymerasesystem	32
2.2.1.	Transkription	32
2.2.2.	Die Methylierung der DNS und die RNS-Synthesehemmung	33
3.	Chemische Reaktionen des NNMG, die zur Mutation führen können, und die Untersuchung der Methylierung der Nucleinsäuren in vitro und in vivo	35
3.1.	Die Reaktionen des NNMG im Hinblick auf die Mutagenese	35
3.1.1.	Die Nitroguanylierung	35
3.1.2.	Die Desaminierung der Nucleobasen	36
3.1.3.	Methylierung durch NNMG	37
3.2.	Untersuchung der Methylierung in vitro	38
3.2.1.	Die Methylierung der einzelnen Nucleinsäuren	38
3.2.2.	Die Methylierung als Funktion der Zeit und des p_H-Wertes	39
3.2.3.	Die Methylierung der Phosphorsäurediester in den Nucleinsäuren	40
3.3.	Methylderivate der Nucleobasen bei der Reaktion mit NNMG	42
3.3.1.	Die Methylierung des Guanins in Poly-UG	42
3.3.2.	Die Methylierungsprodukte des Adenins und der Polyadenylsäure	43
3.3.3.	Methylierungsprodukte des Cytosins und der Polycytidylsäure	44
3.3.4.	Besonderheiten der Methylierung der DNS und RNS	44
3.4.	Der Reaktionsmechanismus der Methylierung	44
3.4.1.	Der Mechanismus der Nitrosamide über Diazomethan	44
3.4.2.	Nicht über Diazomethan führende Methylierungsmechanismen	46
3.4.3.	Eine Hypothese für den Methylierungsmechanismus von NNMG	47
3.5.	Nachweis der Methylierung durch NNMG in vivo	49
4.	Untersuchungen der Inaktivierung und Resistenzausbildung durch NNMG	51

4.1.	DNS- und RNS-Synthesehemmung durch NNMG in der Zelle	51
4.2.	Die Hemmung der zellfreien Proteinbiosynthese mit Extrakten aus NNMG-behandelten Bakterienzellen	53
4.3.	Die Inaktivierung der Ribosomen nach Behandlung der Bakterienzellen mit NNMG	53
4.4.	Untersuchung der Ursachen der Resistenzausbildung bei E. coli B	55
5.	Die Methylierung der Nucleinsäuren in der Zelle und die Aktivierung der Methylierung in vitro durch Sulfhydrylverbindungen	58
5.1.	Die Frage der enzymatischen Aktivierung des NNMG bei der Methylierung in der Zelle	58
5.2.	Die Methylierung der DNS in vivo und in vitro	59
5.2.1.	Untersuchung der Methylierung der DNS in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert	59
5.2.2.	Das Mutantenspektrum in Abhängigkeit vom p_H-Wert	61
5.2.3.	Aktivierung und Optimum der Methylierung in Gegenwart von Cystein	62
5.3.	Nähere Untersuchung der Aktivierung der Methylierung	63
5.4.	Die Methylierung in der Zelle und in vitro	65
5.4.1.	Natürliche Methylderivate der Nucleobasen und über ihre enzymatische Entstehung	65
5.4.2.	Hypothesen für einen Reaktionsmechanismus der Methylierung durch NNMG in Gegenwart von Sulfhydrylverbindungen	67
5.4.3.	Die Methylierung in der Zelle	69
6.	Über die Mutationsauslösung durch NNMG	71
6.1.	Ein Vergleich des NNMG mit anderen alkylierenden Mutagenen	71
6.2.	Über die Funktion der Methylgruppen in den Nucleinsäuren	72
6.3.	Mechanismen der Mutationsauslösung für alkylierende Mutagene	73
6.3.1.	Die Code-Änderung als direkte Folge einer Alkylierung der Basen durch das Mutagen	74

6.3.2. Code-Änderung auf Grund eines Basenverlustes als Folge einer Alkylierung 76
6.3.3. Andere Mechanismen der Mutationsauslösung 78
6.4. Einrichtungen der Zelle zum Schutz der Kontinuität der Vererbung 80
6.4.1. Die Degeneration des genetischen Codes 80
6.4.2. Höhere Paarungsspezifität bei Codons mit GC-Zusammensetzung 80
6.4.3. Mutationen zu "ähnlichen Aminosäuren" 81

E x p e r i m e n t e l l e r T e i l

Chemikalien 84
Häufig verwendete Geräte 84
Häufig gebrauchte Medien und Puffer 85
Verwendete Stämme 86
Radioaktivitätsmessungen 86
Proteinbestimmung nach Lowry 86
1. Radioaktive Synthesen und Halbwertszeitbestimmung von NNMG und Mutationsversuche mit Mikroorganismen 87
1.1. Synthesen der radioaktiven NNMG-Verbindungen 87
1.2. Bestimmung der Halbwertszeit des NNMG 88
1.3. Bestimmung der Mutationsrate von E. coli B in Abhängigkeit vom p_H-Wert 89
1.4. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei E. coli B 90
1.5. Untersuchung der Abtötung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli, S. cerevisiae und B. subtilis 90
1.6. NNMG-Aufnahme bei E. coli B im Komplettmedium 92
2. Ausführung von Modellversuchen an NNMG-behandelten Nucleinsäuren mit Protein- und RNS-Synthesesystemen 92
2.1. Versuche mit dem Proteinsynthesesystem 92
2.1.1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung der Ribosomen- und S 100-Fraktionen 92
2.1.2. Behandlung der Nucleinsäuren mit NNMG 94
2.1.3. Das Aminosäureeinbausystem 94
2.2. Bestimmung der Transfer- und der Akzeptoraktivität 95

2.3.	Versuche mit dem Polymerasesystem	96
3.	Experimente zur Methylierung der Nucleinsäuren in vitro und in vivo	97
3.1.	Methylierungen der Nucleinsäuren in vitro	97
3.2.	Nachweis der Methylderivate der Nucleobasen	98
3.3.	Methylierung der Nucleinsäuren in vivo	101
3.3.1.	Inkubation der Bakterien in Komplettmedium und in Pufferlösung	101
3.3.2.	Die Trennung der Nucleinsäuren und des Proteins mit Hilfe des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten	101
4.	Versuche zur Inaktivierung und Resistenzausbildung durch NNMG bei E. coli	102
4.1.	Untersuchungen der Nucleinsäuresynthese-Hemmungen durch NNMG	102
4.2.	Proteinbiosynthese mit Ribosomen aus behandelten Bakterien	103
4.3.	Untersuchung der Ribosomen aus NNMG-behandelten Bakterien	103
4.3.1.	Isolierung der Ribonucleinsäuren	103
4.3.2.	Die Saccharose-Gradientenzentrifugation	104
4.4.	Untersuchung der Resistenzausbildung durch NNMG	105
5.	Versuche zur Deutung des Mutationsoptimums durch die Methylierung mit Hilfe von Sulfhydrylverbindungen	106
5.1.	Untersuchung der Methylierung der DNS in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert	106
5.2.	Bestimmung der Mutationsrate und der Mutanten	107
5.3.	Methylierungsversuche mit NNMG in Gegenwart von Sulfhydrylverbindungen	110
5.4.	Versuche zur Umsetzung von Cystein mit NNMG	111
5.5.	Abschätzung der Methylierung der Nucleotide in vivo	113
Zusammenfassung		114
Literaturverzeichnis		117

Mutation und Mutationsauslösung durch Chemikalien

Unter Mutation versteht man die Veränderung einer sonst mit großer Konstanz weitergegebenen Information der Vererbung. Die Mutationstheorie, von de Vries begründet, gab Darwins Evolutionstheorie in der Mutabilität das gesuchte Prinzip, das die Strenge der Vererbung durchbricht (1). Die Mutabilität schafft die Mannigfaltigkeit der Erbänderungen, auf die nach der modernen Evolutionstheorie weitere Faktoren richtunggebend einwirken, z.B. Selektion, Isolation und Populationswellen. Der Evolution der Gestalt, der Anatomie und des Verhaltens muß eine Entwicklung der Zellinhaltsstoffe, wie Nucleinsäuren und Proteine, auf molekularer Ebene entsprechen, die zunehmend Gegenstand der Evolutionsforschung wird (2).

Eine weitere Bedeutung erhält die Mutationsforschung durch die Unentbehrlichkeit auxotropher Mutanten zur Aufklärung biochemischer Syntheseketten (3). Man ist hier an wirksamen, eine Mutantenvielfalt erzeugenden und wenig abtötenden Mutagenen interessiert.

In den letzten Jahrzehnten konnte als stoffliche Grundlage der Vererbung bei Organismen die Desoxyribonucleinsäure (DNS) der Chromosomen festgestellt werden, die Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin enthält. Die Desoxyribosephosphorsäure-Derivate dieser Basen sind zu hochmolekularen Polynucleotiden durch Veresterung der Desoxyribose in 3'- und 5'-Stellung mit der Phosphorsäure verknüpft. Nach dem Strukturmodell der DNS von Watson und Crick (4) werden zwei Polynucleotidstränge durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den komplementären Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin, um eine gemeinsame Achse gewunden, in einer Doppelhelix zusammengehalten. Beide Stränge besitzen eine gegenläufige Polarität, da die Phosphorsäurediester in einem Strang die Bindung von der 3'-Stellung des Zuckers über das Phosphat zur 5'-Stellung und im anderen Strang von der 5'-Stellung zur 3'-Stellung des benachbarten Zuckermoleküls aufweisen.

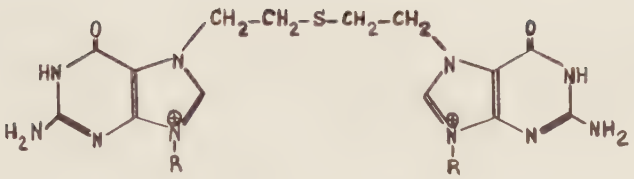
Schon 1943 nahm E. Schrödinger (5) eine "Art Schlüsselschrift" für die Weitergabe der Erbinformation an. Tatsächlich erwies sich, daß der Bauplan der Proteine, die Sequenz der Aminosäuren, in der Basensequenz der DNS durch einen Triplettbasencode verschlüsselt vorliegt. Bei der DNS-Verdopplung trennen sich die beiden DNS-Stränge, worauf die komplementären Nucleotide an den als Matrize dienenden Einzelsträngen zu neuen Partnersträngen aufgebaut werden (Replikation).

Mutationen lassen sich chemisch auf eine Änderung der Basensequenz zurückführen, die durch Einwirkung von Mutagenen verursacht werden kann. Bei den meisten Mutanten liegen Punktmutationen vor. Bei ihnen betrifft das mutagene Ereignis die Nucleobasen als kleinste Abschnitte eines Gens. Veränderungen in der Architektur des Chromosoms sind daher nicht zu erkennen.

Mutagene schaffen die Möglichkeit, die Veränderung der genetischen Information weit über die spontane Mutationsrate hinaus zu steigern. Mutagene Wirkungen werden von UV-Licht, ionisierenden Strahlen, z.B. Röntgen- und γ-Strahlen, Hitze, Säuren und bestimmten Chemikalien erzeugt. Die ersten eindeutigen Mutationsauslösungen durch chemische Mutagene werden Auerbach und Robson (1940) zugeschrieben (6). Nach der Wirkung auf die Erbsubstanz (DNS) lassen sich mehrere Mutagen-Gruppen unterscheiden.

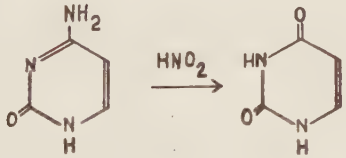
Eine Schubmutation ("frame-shift") wird durch Acridine, z.B. Proflavin (Sulfat des 2,8-Diaminoacridins), erzeugt. Sie verursachen Ausfälle (Deletionen) oder Einfügungen (Insertionen) der Nucleobasen (7). Bei diesen sog. (+)-(-)-Mutanten wird dadurch der Nucleotid-Raster um eine Stelle verschoben.

Die zweite Gruppe bilden bifunktionelle Agenzien, wie die Alkylierungsmittel Senfgas (ß,ß'-Dichlordiäthylsulfid) oder Stickstoff-Lost (z.B. Methyl-bis-ß-chloräthylamin). Sie vernetzen die beiden komplementären DNS-Stränge einer Doppelhelix (Cross-linking-Phänomen) (8, 9, 10). Chemisch erfolgt eine Substitution in 7-Stellung an zwei gegenüberliegenden Guanin-Molekülen:



Die so entstehende Brücke behindert die Replikation und führt zum Verlust des Basenpaares. Es wird daher angenommen, daß bifunktionelle Mutagene in höherem Maße zu Mutanten mit Deletionen von einer bis zu mehreren Basen führen (11, 12).

Bei den O-Typ-Mutationen der dritten und zahlreichsten Gruppe chemischer Mutagene bleibt der Raster in Phase. Daher kompensieren sie i.allg. keine Schubmutationen. Basenanaloga wie 5-Bromuracil und 2-Aminopurin, werden zunächst regulär in die DNS eingebaut. Durch ihr andersartiges chemisches Verhalten bedingen sie jedoch einen Replikationsfehler, der zu einer Mutation führen kann (13). Die Mehrzahl der chemischen Mutagene scheint aber mit den Nucleotiden bzw. Nucleobasen der bereits fertiggestellten DNS zu reagieren. Die Wirkungsweise des recht gut untersuchten Mutagens salpetrige Säure beruht hauptsächlich auf einer Desaminierung der Basen Cytosin zu Uracil



sowie des Adenins zu Hypoxanthin und des Guanins zu Xanthin. Die so veränderten Basen Uracil bzw. Hypoxanthin verhalten sich bei der Replikation wie Thymin bzw. Guanin (14, 15).

Die mutagene Wirkung des Hydroxylamins besteht vor allem in einer Umsetzung mit Cytosin zu Cytosinoxim (16), das sich bei der Basenpaarung wie Thymin verhält. Die Mutationsauslösung durch Hydrazin und seine Derivate (17) beruht vermutlich auf einer Entfernung der Pyrimidine von den Nucleinsäuren (18, 19), da chemisch mit Uracil, Thymin und Cytosin Pyrazolderivate entstehen (20, 21).

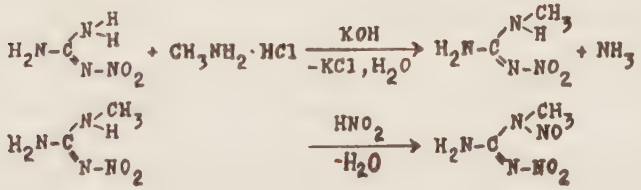
Besondere Bedeutung haben alkylierende Mutagene gewonnen, wie Dimethylsulfat, Methansulfonsäuremethylester und Methansulfonsäureäthylester (22). Zur Gewinnung biochemischer Mangelmutanten zeichnet sich der Methansulfonsäureäthylester durch eine hohe Ausbeute vitaler Mutanten bei gleichzeitig geringer Inaktivierung aus (23, 24). Die mutagene Wirkung wird mit einer Äthylierung des Guanins unter Bildung des 7-Äthylguanins erklärt, das chemisch aus der Nucleinsäure freigesetzt werden kann (25). Methansulfonsäureäthylester wird jedoch in seiner Wirksamkeit von einem in letzter Zeit sehr bekannt gewordenen Mutagen übertroffen: 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG). Mit ihm erzielt man ebenfalls eine hohe Ausbeute an Mutanten bei geringer Abtötung. Nach A. J. Müller und Gichner ist aber nur 1/50 der molaren Konzentration erforderlich, die bei Methansulfonsäureäthylester notwendig ist, um die gleiche Wirkung zu erzielen (26). Seinen Wirkungsmechanismus klären zu helfen, war Aufgabe dieser Arbeit.

T H E O R E T I S C H E R T E I L

1. Eigenschaften von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) und Wirkungen auf die Zelle

1.1. Eigenschaften des NNMG

NNMG wurde 1947 erstmals von McKay und Wright synthetisiert (27, 28). In einer ersten Stufe wird aus Nitroguanidin und Methylamin in Kalilauge farbloses 1-Nitro-3-methyl-guanidin gebildet, das leicht mit Nitrit in Salpetersäure zu gelbgrünem NNMG nitrosiert werden kann:



Nach den Autoren ist eine Entnitrosierung zum Zwischenprodukt durch Erhitzen mit wässeriger alkoholischer Lösung von N-Methyl- oder N-Äthylanilin möglich. Bereits längeres Sieden in 95%igem Alkohol führt zu einer teilweisen Entnitrosierung. In saurem Milieu kann auf diese Weise entstehende salpetrige Säure nachgewiesen werden. McKay stellte auch fest (28), daß Stickoxide entstehen, wenn die Substanz dem Sonnenlicht ausgesetzt wird, womit ein Farbwechsel von gelb nach blaugrün verbunden ist.

1.1.1. Reaktionen des NNMG nach McKay

Mit einer Ausbeute von 72,6% gelang es McKay (29), aus NNMG in wässeriger Kalilauge Diazomethan herzustellen:

Unter den sonst zur Diazomethan-Gewinnung verwendeten Verbindungen der Stoffklasse Nitrosamide, wie N-Nitroso-N-methyl-harnstoff, N-Nitroso-N-methyl-urethan, N-Nitroso-N-methyl-acetamid und Oxalsäure-bis-(N-Nitroso-N-methyl-amid) (30), ragt NNMG mit dieser Ausbeute hervor.

McKay fand als weitere Reaktion des NNMG die Nitroguanylierung von Aminen (27) (s. 3.1.1.).

1.1.2. Strukturformel und UV-Spektrum

Nach physikalisch-chemischen Untersuchungen (31) gilt für Nitroguanidin eine symmetrische Strukturformel, die entsprechend auf das Derivat NNMG angewandt wurde.

Als Absorptionsmaximum im UV-Bereich gibt Eisenstark die Wellenlänge 260 nm an(32). Takahashi und Barnard (33) beobachteten dagegen die Bande bei 279 nm in dest. Wasser und in gepuffertem Minimalmedium bei p_H 7. Druckrey und Mitarbeiter fanden sie bei 275 nm ($\log \varepsilon = 4{,}26$) (34). Eigene spektroskopische Untersuchungen bestätigten das Maximum von 279 nm. Mit zunehmender Hydroxylionen-Konzentration ist jedoch eine Verschiebung in den kurzwelligen Bereich festzustellen. Gleichzeitig sinkt die Extinktion. Beim Behandeln mit 2 n Natronlauge stellt sich rasch ein Absorptionsmaximum bei 264 nm ($\log \varepsilon = 4{,}11$) ein, das sich beim Ansäuern nicht mehr in den langwelligen Bereich verschiebt. Es hat also eine Zersetzung der Substanz stattgefunden.

Tab. 1: Das UV-Maximum des NNMG bei verschiedenen p_H-Werten

p_H	4,0	5,0	6,0	7,0	7,5	2 n Natronlauge
in nm	279	279	279	279	277	264
$\log \varepsilon$	4,22	4,22	4,22	4,22	4,19	4,11

Im sichtbaren Bereich liegt eine Absorptionsbande bei 400 nm ($\log \varepsilon = 2{,}19$).

1.1.3. Toxische und allergische Wirkungen

Von NNMG verursachte toxische Wirkungen auf der Haut beschreibt bereits McKay (29). Sie sind von Brennen und Juckreiz begleitet. Die roten Flecken gehen bald in einen Bläschenherd über, der in zwei Wochen abheilt. Lokale Nekrosen auf der Haut schildern auch Druckrey und Mitarbeiter (34) bei Ratten. Ganz ähnliche Erscheinungen auf der Haut wurden schon von v. Pechmann 1895 bei der Diazomethan-Gewinnung aus N-Nitroso-N-methyl-urethan beobachtet (35). Sie sind vermutlich für die Stoffklasse der Nitrosamide charakteristisch.

Bei eigenen Versuchen mit NNMG machte sich eine allergische Reaktion sehr unangenehm bemerkbar, die sich u.a. in heftigem Juckreiz am ganzen Körper äußerte.

1.1.4. Cancerogen und Cytostatikum

NNMG wirkt cancerogen. Druckrey und Mitarbeiter (34) stellten bei Ratten nach subcutaner Injektion Fibrosarkome, polymorphzellige Sarkome, ein Rundzellen-Sarkom und ein Gallengangs-Adenom fest. Fibrosarkome nach subcutaner Applikation fand auch eine japanische Forschergruppe bei Ratten (36).

Auch cytostatische Wirkungen (37, 38) entfaltet NNMG, z.B. gegen Ascites-Tumoren bei Mäusen (39).

1.1.5. Mutationsauslösung bei verschiedenen Organismen

Mandell und Greenberg entdeckten 1960 in NNMG ein neues Mutagen an verschiedenen Stämmen von Escherichia coli (40). Es wurde dann bei zahlreichen Organismen untersucht, z.B. bei Bacillus subtilis (41), Salmonella typhimurium (32), bei der Blaualge Anacystis nidulans (42), den Pilzen Saccharomyces cerevisiae (43, 44) und Neurospora crassa (45).

McCalla fand bei der Grünalge Euglena gracilis bei p_H 3,5 in großer Mutationsrate bei geringer Abtötung einen erblichen Verlust der Fähigkeit, Chloroplasten zu bilden (46).

Eine vergleichbar starke "Bleichung" war mit anderen Mutagenen mit solchen Konzentrationen nicht zu beobachten, die eine ähnlich geringe Abtötung aufwiesen. Der Autor vermutet eine Einwirkung auf die Chloroplasten-DNS, die zu 78% aus Adenin/Thymin gegenüber 47% in der Kern-DNS besteht.

Nichtchromosomenmutationen wurden auch neben Chromosomenmutationen bei der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardi (47) festgestellt. Chromosomenveränderungen zeigten sich an Samen der Crucifere Arabidopsis Thaliana (26) und an der Papilionacee Vicia faba (48).

1.2. Die Problematik der mutagenen Wirkung bei NNMG

Über den Mutationsmechanismus ist bisher kaum etwas bekannt gewesen. Wegen der Diazomethanbildung in alkalischem Milieu (29) und der mutagenen Wirkung zahlreicher alkylierender Agenzien, wie Dimethylsulfat (49), Diäthylsulfat (32), Methansulfonsäuremethylester (50), Methansulfonsäureäthylester (24, 25) und selbst Diazomethan (51) wird einerseits eine Methylierung der Nucleinsäure erwogen. Andererseits wird wegen der salpetrigen Säure, die bei der Hydrolyse des NNMG im sauren Bereich entsteht, eine Desaminierung der Nucleobasen diskutiert. Hierbei ergibt sich jedoch ein Widerspruch: Im Bereich des Optimums der Mutationsrate bei p_H 6 für E. coli K 12 mit Val^R-Mutanten (52) bzw. bei p_H 5,5 mit E. coli H und S (40) ist sowohl die Bildung von Diazomethan als auch von salpetriger Säure nicht zu erwarten. Im alkalischen Bereich wurden bei p_H 8,9, wo schon eher eine Diazomethanbildung denkbar wäre, bereits keine Mutanten mehr gefunden (48).

Diese Schwierigkeiten der Deutung eines Mutationsmechanismus veranlaßten Mandell und Greenberg (40), einen direkten Angriff des intakten NNMG-Moleküls auf die DNS anzunehmen. Nach dieser Hypothese ist NNMG selbst das mutagene Agens, nicht daraus gebildetes Diazomethan oder salpetrige Säure. Marquardt und Mitarbeiter dagegen, die zahlreiche Nitrosamine und Nitrosamide auf Mutagenität untersuchten, hielten an einem indirekten An-

griff des Moleküls fest. Dieser Annahme zufolge stellt das intakte NNMG-Molekül die Transportform dar, aus der die Wirkform, das Diazomethan, entsteht (51). Diese Hypothese stützten die Autoren durch den erwähnten Nachweis der mutagenen Wirkung des Diazomethans, der trotz experimenteller Schwierigkeiten gelang. Wegen der hohen Reaktivität dürfte es Diazomethan nur schwer möglich sein, bis an die DNS zu gelangen. In einem Transportmolekül gewissermaßen stabilisiert, wird diese Schwierigkeit umgangen, und an der DNS kann es als mutagene Wirkform freigesetzt werden.

1.3. Untersuchungen der Wirkungen des NNMG auf die lebende Zelle

Die chemische Reaktivität des NNMG bei p_H 5,5 - 6,0 schien demnach im Widerspruch zu dem Mutationsoptimum in diesem p_H-Bereich zu stehen. Deshalb war es wichtig, die Aufnahme des Mutagens in die Zelle zu untersuchen. Die Größe des Angebots an NNMG in der Zelle bzw. am Mutationsort, der DNS, ist ja die Voraussetzung für die Höhe eines chemischen Umsatzes.

1.3.1. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme bei E. coli als Funktion der Zeit

In eigenen Untersuchungen wurden zunächst bei Escherichia coli B die Beziehungen zwischen Inaktivierung, Aufnahme von NNMG und Mutationsrate in Abhängigkeit von der Zeit erforscht. Dazu wurde in Anlehnung an die Vorschrift von McKay (28) ^{3}H-Methyl-markiertes NNMG hergestellt.

In Phosphatpuffer wurden E. coli-Zellen mit ^{3}H-Methyl-NNMG geschüttelt und in bestimmten Zeitabständen Abtötung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme ermittelt. Abb. 1 zeigt, daß der Mutationsrate die NNMG-Aufnahme parallel folgt. Die maximale NNMG-Aufnahme)$^+$ ist mit einer optimalen Mutationsrate von ca.

)$^+$ Die NNMG-Aufnahme bezieht sich streng nur auf die markierte Methylgruppe bzw. auf ihr Tritiumatom und berücksichtigt nicht die Instabilität des Mutagens

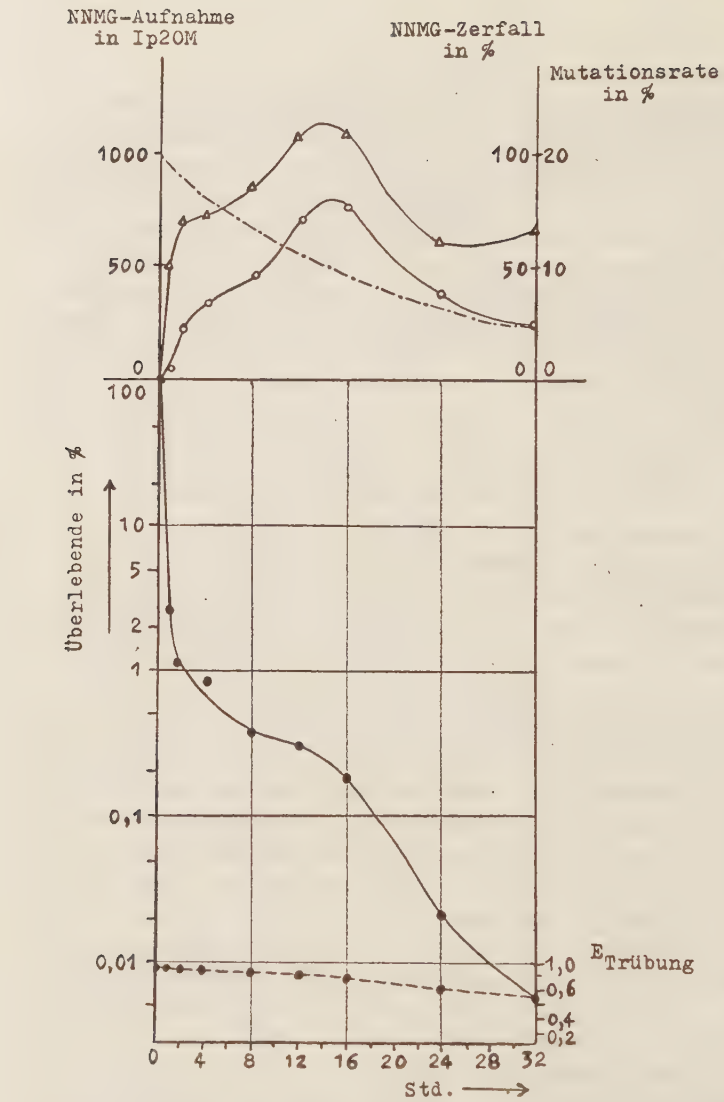


Abb. 1: Abtötung, Mutationsrate, NNMG-Aufnahme u. Zellkonzentration bei E. coli B als Funktion der Zeit (20 γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml, 37°, p_H 6, Phosphatpuffer L1)

16% nach etwa 14 Stunden langer Inkubation verknüpft. Die Abtötungskurve folgt ähnlich wie bei Hefen (43) einer Eintrefferkinetik bis zu einer Abtötung auf ca. 1% Überlebende. Die nun erfolgende Richtungsänderung der Kurve kann auf relativ NNMG-resistente Restpopulationen zurückgeführt werden (vgl. 4.). Dafür sprach bei Saccharomyces, daß bei bis 1% abgetöteten gewaschenen Zellen auch mit frischer NNMG-Lösung nur eine schwache Inaktivierung erzielt werden konnte (43). Nach 14 Stunden, nach Erreichung des NNMG-Aufnahmeoptimums, zeigt sich bei E. coli B eine zweite Richtungsänderung der Inaktivierungskurve, die nun wieder mit einer folgenden stärkeren Abtötung verbunden ist. Die weitere NNMG-Aufnahme führt zu einem erhöhten Absterben der Zellen. Die ständige Abnahme der Zelldichte beruht auf Autolyse. Eine ähnliche Kurve erhielt Schwaier (44) mit NNMG für die Mutations- und Abtötungsrate in Abhängigkeit von der Konzentration. Den gleichen Kurventyp ("Maximum-Minimum-Typ") zeigen auch die Nitrosamide N-Nitroso-N-methyl-urethan und N-Nitroso-N-methyl-acetamid (44). Daraus schließt der Autor auf einen ähnlichen mutagenen Wirkungsmechanismus dieser Stoffe. Nach seinen Ergebnissen ist der Kurventyp von der Abtötungsrate unabhängig und daher wohl in der Aufnahme des Mutagens begründet (44).

1.3.2. Stabilität des NNMG als Funktion des p_H-Wertes

Bei der Beziehung zwischen Abtötung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme als Funktion der Zeit ist die Stabilität des Mutagens zu berücksichtigen. Mandell und Greenberg gaben NNMG bei p_H 5,5 als stabil an (40). Nach Druckrey und Mitarbeitern (34) ist NNMG noch im Bereich von p_H 6 - 7 bei 20° stabil. Druckrey et al. (34) und Schwaier (44) geben bei p_H 7,5 eine Halbwertszeit von 200 Stunden an. Ermittelt man die Halbwertszeit in Abhängigkeit vom p_H-Wert mit Hilfe der Bande bei 400 nm unter Bebrütungsbedingungen für die Mutationsauslösung, findet man ein Maximum der Stabilität bei etwa p_H 5 mit einer Halbwertszeit von ca. 40 Stunden (Tab. 2).

Tab. 2: Beständigkeit von NNMG bei 37° in Abhängigkeit vom p_H-Wert in Citronensäure-Phosphat-Puffer

p_H	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Halbwertszeit in Stunden	12,0	25,8	35,7	39,2	40,0	31,0	14,4	4,85	2,29	1,24	0,63

Der Zerfall war nicht von der Konzentration des NNMG abhängig. Da sich sowohl bei NNMG in konzentrierter Salpetersäure als auch bei p_H 6 das 1-Nitro-3-methyl-guanidin nachweisen läßt, kommt für den Zerfall die Entnitrosierung in Frage.

Die große Labilität des NNMG im alkalischen Bereich kann als Ursache für das Ausbleiben eines mutagenen Effektes bei p_H 8,9 angesehen werden (48). Das Mutationsoptimum für p_H 5,5 - 6,0 läßt sich aber mit der Labilität des NNMG nicht erklären. Untersuchungen von Marquardt und Mitarbeitern (51) und Schwaier (44) mit mehreren Nitrosamiden, wie NNMG, N-Nitroso-N-methyl-urethan, N-Nitroso-N-methyl-harnstoff, N-Nitroso-N-methyl-acetamid, N, N'-Dinitroso-N, N'-dimethyl-terephthalsäureamid, ließen keine Korrelation zwischen Zerfallsgeschwindigkeit und Mutationsrate erkennen. Auch eine Abhängigkeit von der Löslichkeit der Mutagene ließ sich nicht feststellen. Die Annahme, je zersetzlicher eine Verbindung sei, desto mehr alkylierende Wirkgruppen stünden zur Verfügung, wodurch eine höhere Mutagenität bedingt würde, trifft nach einem Vergleich der Nitrosamide nach Marquardt und Mitarbeitern nicht zu (51).

1.3.3. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli

Eine Überprüfung der Mutationsrate als Funktion des p_H-Wertes bei E. coli B ergab ein Mutationsoptimum bei p_H 5,5 (Tab. 3). Mit sinkendem p_H-Wert vermindert sich auch die Mutationsrate. Bei p_H 3 konnten in wiederholten Versuchen keine Mutanten mehr gefunden werden. Die geringe Mutationsrate im sauren Bereich

Tab. 3: Inaktivierung und Mutationsrate in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli B nach 20 Min. Inkubation mit 200 γ NNMG/ml

p_H	Überlebende in %	gestempelte Kolonien	Mutanten in %
3,0	77,2	6624	0,00
3,5	45,6	5560	0,02
4,0	39,3	5575	0,12
5,0	7,7	1008	2,58
5,5	10,3	1100	3,09
6,0	17,2	1432	1,88

bei E. coli im Gegensatz zu den bei Saccharomyces cerevisiae bekannten Ergebnissen (44) legt eine p_H-Abhängigkeit der NNMG-Aufnahme nahe.

Abb. 2 zeigt, daß die NNMG-Aufnahme der Mutationsrate weitgehend entspricht, wie sich besonders gut in der Übereinstimmung der Optima bei p_H 6,0/6,5 zeigt. Diese liegen in einem p_H-Bereich, in dem NNMG im Verhältnis zum Stabilitätsmaximum bei p_H 4,5/5,0 instabil ist. Die Verschiebung des Mutationsoptimums von p_H 5,5 (s. Tab. 3) nach p_H 6,0/6,5 beruht vermutlich auf Unterschieden der NNMG-Konzentration. Trotz der großen Instabilität des NNMG bei p_H 7,5 ist hier die Mutationsrate hoch, während im Bereich großer Stabilität des Mutagens bei p_H 4,0/4,5 weniger Mutanten zu finden sind, obwohl die NNMG-Aufnahme nicht viel geringer ist. Die Inaktivierung der Bakterien im sauren p_H-Bereich entspricht nach 2stündiger Behandlung mit NNMG der Stabilität des Mutagens. Die stärkere Abtötung bei p_H 3,5 und 4,0 im Vergleich zu p_H 4,5 kann vor allem auf das NNMG-Zerfallsprodukt salpetrige Säure zurückgeführt werden. Dafür spricht, daß nach 5stündiger NNMG-Einwirkung bei annähernd gleich starker Abtötung in dem geprüften p_H-Bereich verhältnismäßig wenige Mutanten bei p_H 3,0 bis 4,5 zu finden sind (53). HNO_2 aber wirkt gegenüber NNMG schwach mutagen.

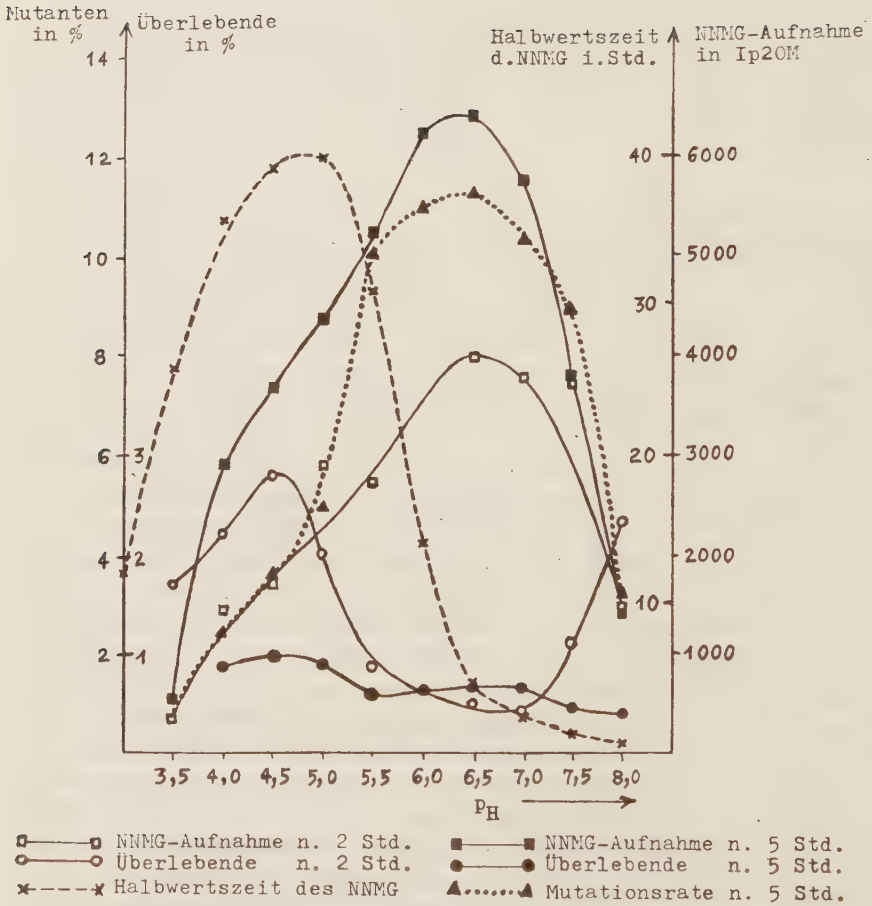


Abb. 2: NNMG-Aufnahme, Inaktivierung und Mutationsrate bei E. coli B als Funktion des p_H-Wertes (20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml, p_H 6, 37° in Citronensäure-Phosphat-Puffer)

1.3.4. Wachstum von E. coli-Populationen unter NNMG-Zusatz und deren NNMG-Aufnahme bei verschiedenen p_H-Werten

Eine Untersuchung des Wachstums von E. coli-Populationen im Komplettmedium in Abhängigkeit vom p_H-Wert läßt mit zunehmender Hydroxylionenkonzentration (s. Abb. 3) eine rascher werdende Zellvermehrung erkennen. In der Folge p_H 5 bis 8 wird die Ruhephase bei immer höheren Zellkonzentrationen erreicht.

Bei NNMG-Zusatz tritt zunächst eine Verringerung der Zellkonzentration durch Autolyse auf. Nach teilweise erheblicher Verlängerung der Anlaufzeit (lag-Phase), besonders bei niederen p_H-Werten, folgt die Exponentialphase. Die stärkste Hemmung zeigt sich bei p_H 6 und auch bei p_H 5. Bei p_H 5 ist nach 24 Std. die Zelldichte der Ruhephase unbehandelter Bakterien noch nicht erreicht, während die NNMG-behandelten Bakterien bei p_H 7 und 8 gegenüber dem Kontrollversuch zu einer höheren Zellkonzentration angewachsen sind. Die Unterschiede der Bakterienvermehrung, die bei Zusatz von NNMG auftreten, können vor allem auf die zunehmende Instabilität des Mutagens und auf die verringerte NNMG-Aufnahme zurückgeführt werden. Die Instabilität des NNMG wird durch die Anwesenheit des Hefeextrakts noch gesteigert (54).

Tabelle 4 zeigt die NNMG-Aufnahme durch Zellen von E. coli im Komplettmedium als Funktion des p_H- Wertes. Der stärkere Abfall

p_H-Wert	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
NNMG-Aufnahme in Ip2OM	446	2139	3365	4458	4314	4912	4212	1611	274	136
$E_{Trübung}$ (Eppendorf)	0,77	0,67	0,66	0,68	0,68	0,71	0,74	1,34	1,17)$^+$	1,34)$^+$
NNMG-Aufnahme in 10^2.Ip2O M/OE)$^{++}$	5,8	32	51	56	63	69	57	12	-	-

Tab. 4: Aufnahme von ^{3}H-Methyl-NNMG im Hefeextrakt-Glucose-Medium in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli B (5 Std. mit 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml inkubiert)
)$^+$ 1 : 3 verdünnt
)$^{++}$ OE: optische Einheit

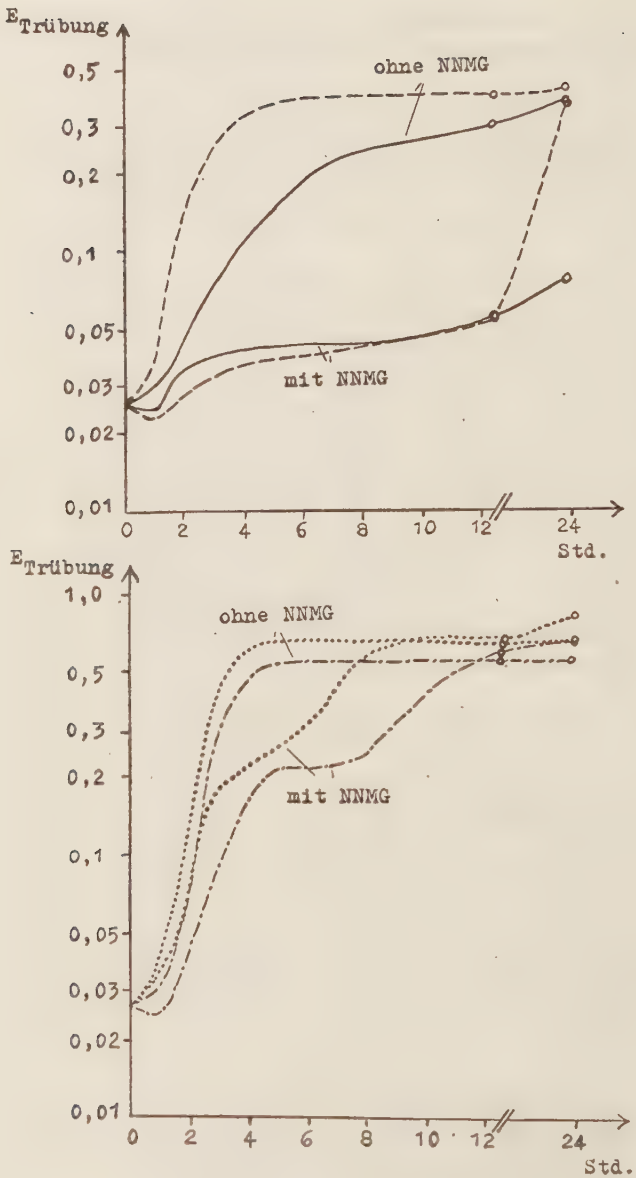


Abb. 3:
Wachstum von E. coli-Populationen (Stamm B) unter Zusatz von 25 γ NNMG/ml bei verschiedenen p_H-Werten im Hefeextrakt-Glucose-Medium bei 37° unter Schütteln (Trübungsmessung im Lange-Kolorimeter)

der NNMG-Aufnahme im neutralen bzw. schwach basischen Bereich gegenüber den Versuchen in Pufferlösung läßt sich mit der intensiveren Vermehrung der Bakterien in diesem Milieu erklären, das besonders für NNMG-resistente Bakterien mit geringerem NNMG-Aufnahmevermögen gilt (s. 4.4.).

1.3.5. NNMG-Aufnahme und Mutationsrate bei S. cerevisiae in Abhängigkeit vom p_H-Wert

Für Saccharomyces cerevisiae wurde mit der Adenin-Mangelmutante ad_{6-45} von Zimmermann et al. ein Mutationsoptimum bei p_H 6 festgestellt (55). Zum Unterschied von E. coli sind aber auch noch bei niederen p_H-Werten Mutanten zu finden. Für eigene Versuche wurde die rote Hefemutante E 188 ad^- verwendet. Nach Abb. 4 stimmt das Mutationsoptimum bei p_H 5,5/6,0 mit den Ergebnissen von Zimmermann et al. recht gut überein. Der Verlauf der Permeationskurve, die bei ähnlicher Größe des Produkts aus NNMG-Konzentration und Inkubationszeit gewonnen wurde, entspricht der Mutationsrate. Die stärkere NNMG-Aufnahme auch bei niederen p_H-Werten macht die in diesem Bereich noch feststellbare merkliche Mutationsrate verständlich.

Ein ganz anderer Verlauf der p_H-Abhangigkeit der NNMG-Aufnahme konnte bei Bacillus subtilis B 23 nach 4stündiger NNMG-Einwirkung gefunden werden. Wie aus der Abb. 4 hervorgeht, liegt das Aufnahmeoptimum bei p_H 7,5.

Die Beziehungen zwischen der Aufnahme des Mutagens, der Mutationsrate und der Abtötungsrate lassen erkennen, daß bei den Bemühungen, das Mutationsoptimum zu deuten, auch die Permeationsverhältnisse zu berücksichtigen sind, die bisher nicht gebührend beachtet wurden.

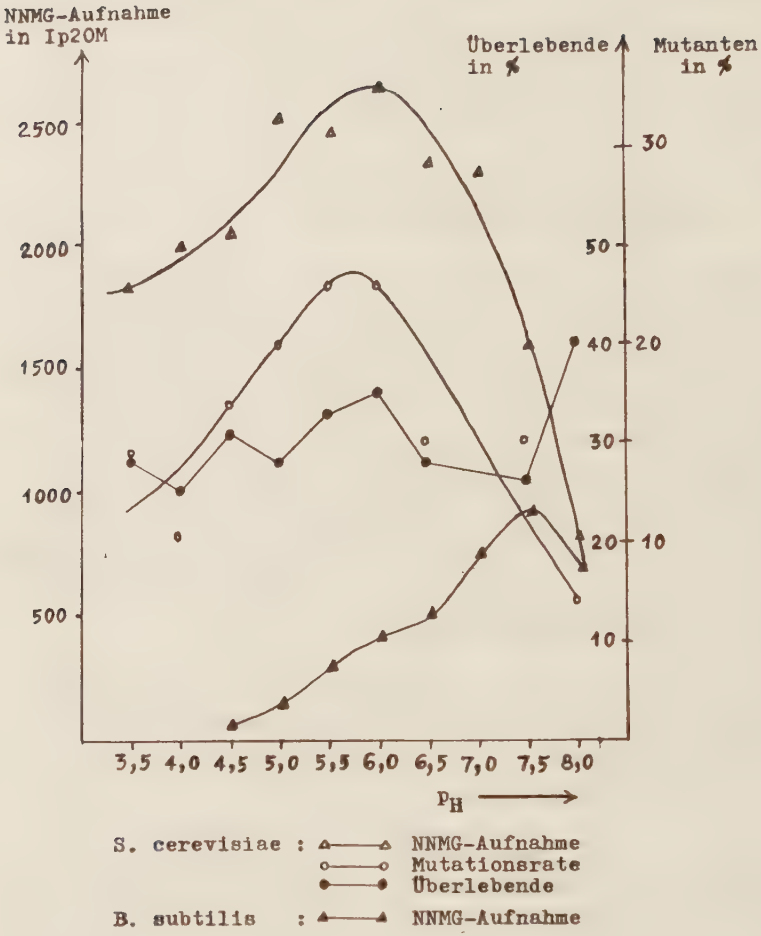


Abb. 4: NNMG-Aufnahme (20γ NNMG/ml, 5 Std. bei 30°), Mutationsrate und Abtötung (250γ NNMG/ml, 30 Min. bei 30°) bei S. cerevisiae und NNMG-Aufnahme bei B. subtilis (20γ NNMG/ml, 4 Std. bei 37°) als Funktion des p_H-Wertes (Citronensäure-Phosphat-Puffer)

2. Modellversuche in vitro an NNMG-behandelten Nucleinsäuren mit Protein- und RNS-Synthesesystemen

Eine weitere Möglichkeit, die Mutationsauslösung durch NNMG aufzuklären, bietet die Erforschung der durch das Mutagen veränderten Basen der DNS bei der Replikation und bei der RNS-Synthese, der Transkription (Abb. 5). Ein geeignetes Modellsystem bildet hierfür die zellfreie Proteinbiosynthese nach Nirenberg und Matthaei (56). Es bietet u.a. den Vorteil, durch Verwendung von Homopolynucleotiden die Veränderung von Uracil, Cytosin, Adenin und auch Guanin durch das Mutagen zu untersuchen.

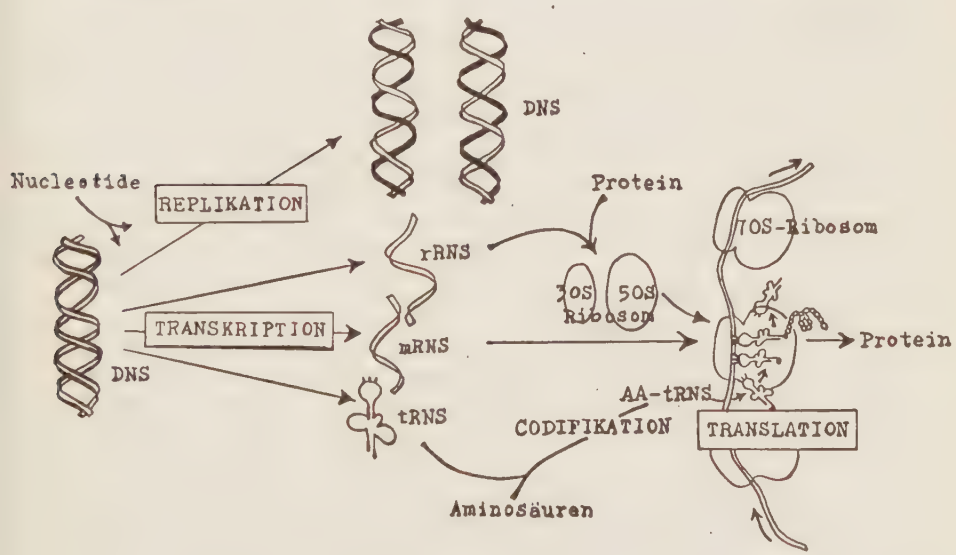


Abb. 5: Schema der Synthesen der Nucleinsäuren u. des Proteins

2.1. Untersuchungen mit Hilfe der Proteinbiosynthese

Die Biosynthese der Proteine soll im folgenden kurz skizziert werden (57, 58, 59, 60). Alle drei an der Proteinsynthese be-

teiligten Ribonucleinsäuren werden an der DNS-Matrize synthetisiert, "transkribiert". Sie unterscheiden sich von der DNS durch eine OH-Gruppe in 2'-Stellung der Ribose und durch Uracil anstelle des Thymins.

2.1.1. Die Ribonucleinsäuren und der genetische Code

Die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNS) mit einem Molekulargewicht von ca. 25 000 erfahren nach der Synthese ihres Makromoleküls noch nachträgliche Veränderungen, die hauptsächlich in Methylierungen ihrer Nucleotide bestehen. Sie enthalten etwa 80 Nucleotide und können am CCA-Ende (bzw. CpCpA-Ende) in 3'-Stellung der Ribose des Adenosins einer spezifischen Aminosäure verestert werden (Abb. 6).

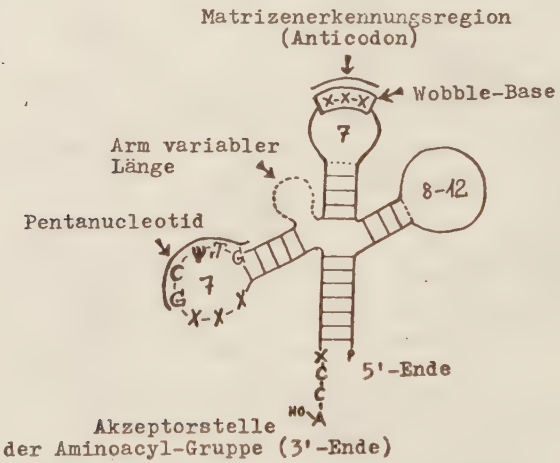


Abb. 6: "Kleeblattstruktur" der Transfer-RNS nach Fuller et al. (70), verändert

Die Ribosomen-Ribonucleinsäuren (rRNS), die 85% der RNS in der Zelle bilden, sind zu 2/3 am Aufbau der aus Protein und Ribonucleinsäuren bestehenden Ribosomen beteiligt, an denen die Proteinsynthese stattfindet. Bei E. coli bestehen sie

aus 30-S- und 50-S-Untereinheiten, in denen die rRNS die Molekulargewichte $0{,}55 \cdot 10^6$ und $1{,}15 \cdot 10^6$ aufweist. Mit steigender Magnesiumionen-Konzentration aggregieren sie zu höheren Ribosomeneinheiten, 70 S und auch 100 S.

Die Messenger-Ribonucleinsäuren (mRNS) besitzen Molekulargewichte von 100 000 bis 500 000. In ihrer Basenzusammensetzung ähneln sie sehr der DNS (61). Sie vermitteln als Sendboten der DNS ("messenger") die in der DNS verschlüsselten Informationen zum Bau des Proteins an den Ribosomen im Zellplasma. Die sehr kurzlebige mRNS bildet etwa 3% der Ribonucleinsäuren in der Zelle.

Die Transfer-Ribonucleinsäuren besitzen auf Grund ihrer Spezifität zu bestimmten Aminosäuren eine Schlüsselfunktion in der Proteinbiosynthese. Das Abgreifen der Matrize, der mRNS, erfolgt nach der Adapter-Theorie nicht durch die Aminosäuren direkt, sondern durch eine für jede Aminosäure spezifische tRNS. Die Transfer-Ribonucleinsäuren vermitteln somit den exakten Einbau der Aminosäuren in das Protein nach dem genetischen Code im Prozeß der "Codifikation", wie auch der erste Translationsschritt heißt.

Unter dem genetischen Code versteht man die Zuordnung einer Basensequenz in der mRNS bzw. DNS zu bestimmten Aminosäuren im Protein. Für die Codierung von 20 Aminosäuren stehen 4 Nucleobasen der mRNS zur Verfügung. Zu ihrer Determinierung müssen die Basen in Dreiergruppen, "Tripletts" oder "Codons", als Codierungseinheiten vorliegen, woraus sich 64 Kombinationen ergeben. Diese Triplett-Hypothese konnte mit der Enträtselung des genetischen Codes durch die Arbeitskreise Matthaei-Nirenberg, Ochoa und Khorana (62, 63, 64, 65) auf das glänzendste bestätigt werden. Der Widerspruch zwischen 64 Codons und nur 20 zuzuordnenden Aminosäuren fand in der Degeneration des Codes eine Lösung, d.h. mehrere i.allg. nur in der dritten Base abgewandelte Codons korrespondieren einer Aminosäure (s. Tab. 5). Die Entdeckung, daß die Aminosäuren einen zweifach, vierfach, ja sechsfach degenerierten Code besitzen, engte die Zahl der "Nonsense-

Tab. 5: Die Tabelle der Codons (nach verschiedenen Autoren)

1. Base	2. Base				3. Base
	U	C	A	G	
U	PHE	SER	TYR	CYS	U
	PHE	SER	TYR	CYS	C
	LEU	SER	TERM(OCHRE)	CYS/TERM	A
	LEU/F-MET	SER	TERM(AMBER)	TRP	G
C	LEU	PRO	HIS	ARG	U
	LEU	PRO	HIS	ARG	C
	LEU	PRO	GLN	ARG	A
	LEU	PRO	GLN	ARG	G
A	ILE	THR	ASN	SER	U
	ILE	THR	ASN	SER	C
	ILE	THR	LYS	ARG	A
	MET/F-MET	THR	LYS	ARG	G
G	VAL	ALA	ASP	GLY	U
	VAL	ALA	ASP	GLY	C
	VAL	ALA	GLU	GLY	A
	VAL/F-MET(?)	ALA	GLU	GLY	G

Codons", die einen Abbruch der Proteinkette bedeuten, schließlich auf zwei bzw. drei ein: die Terminalcodons UAG (amber), UAA (ochre) und auch UGA (bei E. coli) (66, 67, 68). Nach zahlreichen Befunden kann der genetische Code als für das gesamte Organismenreich verbindlich, d.h. als universell, gelten (68).

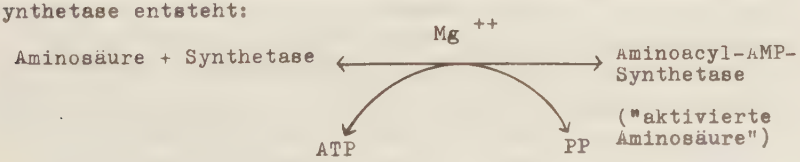
Die Aufgabe der Translation, die Nucleotidsequenz in die Aminosäuresequenz zu übersetzen, wird nach der Anticodon-Hypothese mit Hilfe der Matrizenerkennungsregion der tRNS gelöst. Jede tRNS (Abb. 6) enthält ein Basentriplett als Anticodon, das mit dem komplementären Basentriplett der mRNS eine zeitweilige Bindung durch Wasserstoffbrücken-Bindung eingeht. Diese Basenpaarung erfolgt antiparallel, so daß der dritten Codonbase die

erste Anticodonbase gegenübersteht (s. Abb. 7 a). Für die Existenz des Anticodons spricht das Auftreten der Anticodonregion in exponierter Lage einer aus 7 Nucleotiden bestehenden Schleife einer nach dem Prinzip der maximalen Basenpaarung erhaltenen Sekundärstruktur ("Kleeblattstruktur"). Ferner grenzen die Anticodonregionen der einzelnen Transfer-Ribonucleinsäuren an eine Region konstanter Nucleotidzahl, und nur im Anticodon ist Inosin zu finden. Die Funktion des Inosins klärte die Wobble-Hypothese von Crick (69). Während die normale Basenpaarung nach Watson und Crick streng für die beiden ersten Basen des Codons gilt, trifft sie für die dritte Base, der die "Wobble-Base" des Anticodons gegenübersteht, nicht zu. Für sie gelten die Regeln, daß die Codonbasen Uracil, Cytosin und Adenin von der Inosinbase Hypoxanthin des Anticodons, Uracil und Cytosin von Guanin und Adenin und Guanin von Uracil gelesen werden. Diese Hypothese fordert also für Aminosäuren mit vierfach degeneriertem Code nur zwei Transfer-Ribonucleinsäuren. Plausible Strukturmodelle für die Wobble-Basenpaarung einer Anticodon-Doppelhelix mit einem Codon der mRNS sind bereits bekannt (70).

Die tRNS übt somit bei der Translation zwei Funktionen aus, die Akzeptorfunktion durch Aufnahme einer spezifischen Aminosäure, wodurch die Codifikation erfolgt, und die Transferfunktion durch die Übertragung dieser Aminosäure nach Vorgabe des Codons der mRNS, das die tRNS mit der Anticodonregion liest. Manche Ergebnisse lassen vermuten, daß auch das Anticodon die Akzeptorfunktion beeinflußt (71).

2.1.2. Die einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese

Im ersten Schritt der Proteinbiosynthese werden enzymatisch durch Aminoacyl-Synthetasen unter ATP-Mitwirkung die Aminosäuren aktiviert, wobei das Intermediärprodukt Aminoacyl-AMP-Synthetase entsteht:



Diese "aktivierte Aminosäure" ermöglicht vermöge der Spezifität der Aminoacyl-Synthetasen die relativ stabile Bindung der Aminosäuren an die zugehörige tRNS durch die Veresterung mit der Ribose des Adenosins in 3'-Stellung:

Mit der mRNS bilden die Ribosomen ein Polysom. Die einzelnen Aminoacyl-tRNS-Verbindungen werden an die Ribosomen herangeführt, an denen die Proteinsynthese stattfindet. Die 50-S-Untereinheit des Ribosoms nimmt die zugeführte Aminoacyl-tRNS an einer von der Polypeptid-tRNS getrennten Stelle auf. Die Aminoacyl-tRNS tastet mit ihrer Matrizenerkennungsregion das Codon auf der mRNS an den 30-S-Ribosomen ab (Abb. 7 a). Mit der Codon-Anticodon-Bindung verknüpft ist die Anfügung des Aminoacylrestes an das vorhandene Peptid durch vermutlich an die Ribosomen gebundene SH-haltige, durch Kaliumionen aktivierte Transferasen. Watson vermutete, daß der endständige tRNS-Rest, der durch Magnesiumionen-abhängige Kräfte in einer Höhle des 50-S-Ribosoms festgehalten wird, die Bindung vermittelt (72). Die Aminogruppe der einzubauenden Aminosäure, die an die tRNS gebunden ist, greift die Esterbindung der Polypeptid-tRNS-Verbindung an (Abb. 7 b). Die alte tRNS, die von der zuletzt eingebauten Aminosäure stammt, wird dabei vom Polypeptid gelöst. So entsteht eine neue Polypeptid-tRNS-Verbindung, die um eine Aminosäure verlängert ist. Die mRNS wird um eine bestimmte Strecke relativ zum Ribosom bewegt (73), wofür vermutlich eine GTP-Spaltung die Energie liefert. Das folgende Nucleotidtriplett der mRNS gelangt in die Position, in der eine Basenpaarung mit der tRNS möglich ist.

Den Beginn einer Polypeptidsynthese vermittelt eine enzymatisch formylierbare Methionyl-tRNS (Met-$tRNS_F$) mit dem Einbau des Methionins, wenn diese die "Initialcodons" AUG, UUG oder GUG (s. Tab. der Codons) ablesen kann (74). Durch die Formylierung der Aminogruppe des Methionins ist das Wachstum in Richtung der Carboxylgruppe vorgegeben, da die Aminogruppe blockiert ist.

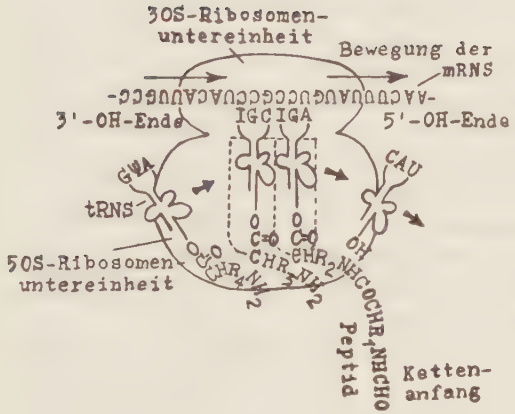
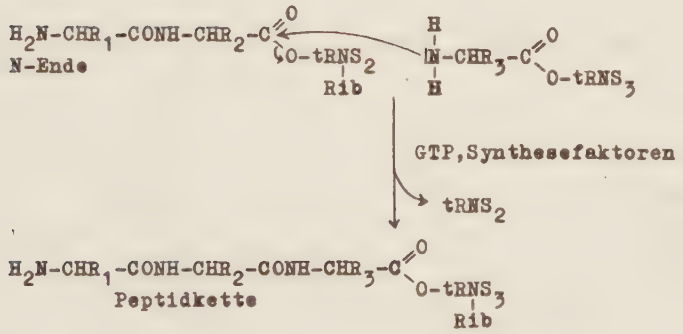


Abb. 7 a und b:
Schemata der Proteinbiosynthese am Ribosom (nach verschiedenen Autoren, verändert). Ψ= Pseudouridin (5-Ribosyluracil) verhält sich wie Uridin



Das N-Formylmethionin kann nachträglich enzymatisch vom Polypeptid entfernt werden. Die Übertragung des Methionins am Anfang der Peptidkette und die Bindung von Formylmethionyl-tRNS an die Ribosomen werden von besonderen Synthesefaktoren ("F_1" und "F_2") reguliert (75), die aber bei der Proteinbiosynthese in vitro nicht erforderlich sind.

2.1.3. Untersuchungen NNMG-behandelter Ribonucleinsäuren mit dem Einbausystem von Nirenberg und Matthaei

Matthaei und Nirenberg gelang 1961 in einem zellfreien System die Synthese von Polyphenylalanin mit Hilfe synthetischer Polyuridylsäure (56).

Eine Behandlung solcher synthetischer Homopolynucleotide mit NNMG ließ in diesem Einbausystem eine Hemmung der Polypeptidsynthese erwarten. Um seine Höhe richtig zu erfassen, wurde der Einbau markierter Aminosäuren in das Protein in Abhängigkeit von der Konzentration NNMG-behandelter Polynucleotide untersucht. Er wurde mit dem Einbau der Aminosäuren verglichen, der mit unbehandelten Polynucleotiden auftrat. Dabei sind alle übrigen Komponenten konstant gehalten worden. Die Abbildungen 8 zeigen, daß die Hemmung der Polypeptidsynthese am starksten bei

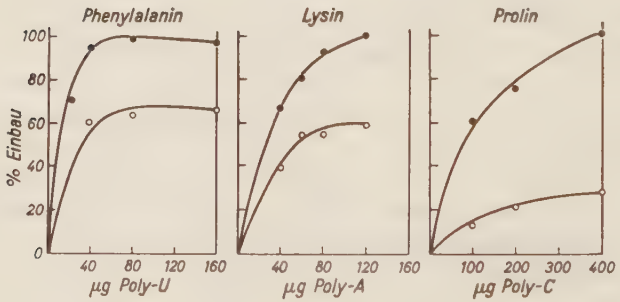


Abb. 8: Einwirkung von NNMG auf die Matrizenaktivität verschiedener Polynucleotide beim Einbau einer Aminosäure in ein Homopolypeptid

Prolin (Poly-C) mit ca. 70% vorliegt, eine geringere ist bei Lysin (Poly-A) und die geringste bei Phenylalanin (Poly-U) zu beobachten.

Es wurde nun mit Hilfe des Einbaus verschiedener Aminosäuren untersucht, wie sich die Matrizenaktivität der Polynucleotide nach einer Behandlung mit NNMG ändert und ob eine Code-Änderung auftritt. Wenn Pyrimidine oder Purine untereinander ausgetauscht werden (Transition (76)), z.B. C → U, oder wenn ein Austausch von Pyrimidin- und Purinbasen gegeneinander erfolgt (Transversion (76)), z.B. C → G, ändert sich der Code.

Tabelle 6 zeigt zunächst die bereits festgestellte Einbauhemmung des Phenylalanins. Ein Einbau der Aminosäuren Serin und Lysin ist nicht zu beobachten. Dagegen wird Leucin von der

Tab. 6: Matrizenaktivität der Polyuridylsäure nach Behandlung mit NNMG

Aminosäure	Codon	Einbau der Aminosäure in IpM/Ribosomenfraktion		
		ohne Poly-U	mit Poly-U (Kontrolle)	mit Poly-U (+ NNMG)
Phenylalanin	UUU UUC	99	4067	3400
Leucin	CUU CUC CUA CUG UUA UUG	185	352	464
Serin	UCU UCC UCA UCG AGU AGC	35	25	17
Lysin	AAA AAG	162	139	128

NNMG-behandelten Polyuridylsäure vermehrt eingebaut. Abell et al. (77) konnte eine Erhöhung des Leucineinbaus feststellen, wenn er alkylierte Polyuridylsäure als mRNS einsetzte.

Eine Code-Änderung ist bei der Polycytidylsäure mit einem Basenübergang von Cytosin nach Uracil und bei der Polyadenylsäure von Adenin nach Hypoxanthin zu erwarten, wenn die Desaminierung der Basen durch NNMG stattfindet.

Wie aus der Tab. 7 hervorgeht, bleibt aber die Matrizenaktivität der behandelten Polycytidylsäure gegenüber Serin, Leucin und Phenylalanin unverändert. Die Behandlung der Polycytidylsäure

Tab. 7: Der Aminosäureeinbau bei Einwirkung von NNMG auf die Matrizenaktivität der Polycytidylsäure

Aminosäure	Codon	Einbau der Aminosäure in 1pM/Ribosomenfraktion	
		Poly-C (Kontrolle)	Poly-C (+ NNMG)
Prolin	CCU CCC CCA CCG	1320	420
Serin	UCU UCC UCA UCG AGU AGC	130	132
Leucin	CUU CUC CUA CUG	55	60
Phenylalanin	UUU UUC	40	41

mit NNMG hat also keine Code-Änderung zur Folge, sondern wirkt sich lediglich in einer Hemmung der Proteinsynthese aus. Daraus muß geschlossen werden, daß unter diesen experimentellen Bedingungen keine Desaminierung des Cytosins erfolgt.

Die Einwirkung von NNMG auf die Polyadenylsäure äußert sich außer in einer Hemmung der Polylysinsynthese in einer Code-Änderung (Tab. 8); denn es wird eine kleine Menge Glutamin-

Tab. 8: Die Änderung der Polypeptidsynthese bei der Einwirkung von NNMG auf die Polyadenylsäure

Aminosäure	Codon	Einbau der Aminosäure in 1pM/Ribosomenfrakt.		
		ohne Poly-A	mit Poly-A (Kontrolle)	mit Poly-A (+NNMG)
Lysin	AAA AAG	376	3014	1011
Glutaminsäure	GAA GAG	1157	981	1644
Arginin	AGA AGG CGU CGC CGA CGG	1575	1054	715

säure eingebaut. Die Code-Änderung von $AA\overset{A}{G}$ (Lysin) nach $GA\overset{A}{G}$ (Glutaminsäure) läßt sich auf eine Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin zurückführen, das wie Guanin von der Matrizenerkennungsregion gelesen wird. Der fehlende Einbau des Arginins kann mit einer zusätzlichen chemischen Veränderung der Polyadenylsäure oder mit dem Grad der Desaminierung zusammenhängen.

Zur Prüfung einer Veränderung des Guanins diente ein mit NNMG behandeltes Mischkondensat aus Adenylsäure und Guanylsäure (5,5 : 1). Wie die Tabelle 9 zeigt, ergaben die Versuche ent-

Tab. 9: Der Einbau der Aminosäuren bei Einwirkung von NNMG auf Poly-AG

Aminosäure	Codon	Einbau der Aminosäure in 1pM/Ribosomenfrakt.		
		ohne Poly-AG	mit Poly-AG (Kontrolle)	mit Poly-AG (+NNMG)
Lysin	AAA AAG	75	1296	860
Glutaminsäure	GAA GAG	216	581	291
Arginin	AGA AGG CGU CGC CGA CGG	240	612	221

sprechend dem zunehmenden Anteil an Guanosin im Triplettcodon eine sinkende Einbautendenz der korrespondierenden Aminosäure.

2.1.4. Einwirkungen von NNMG auf die Transfer- und Akzeptoraktivität

Eine solche sinkende Einbautendenz erhält man auch, wenn die tRNS mit NNMG behandelt wird. Die stärkste Hemmung liegt dann vor, wenn die mRNS von G-haltiger Matrizenerkennungsregion gelesen werden muß (Tab. 10). Das G-haltige Anticodon wurde von NNMG so stark verändert, daß die Polycytidylsäure nur noch schlecht gelesen werden kann. Dies bedingt eine Senkung der Transferaktivität, die eine Verringerung der Bindung der Aminosäure an die tRNS zur Folge hat.

Tab. 10: Die Einwirkung von NNMG auf die Transferaktivität der tRNS

Codon	Anticodon	Aminos. u. Polynucl.	Einbau der Aminosäure in IpM/ Ribosomenfraktion		
			tRNS (Kontrolle)	tRNS (+ NNMG)	%Hemmung
AAA	UUX(?)	Lys mit Poly-A	930	800	14
UUU	AAG^{OMe}	Phe mit Poly-U	770	600	22
CCC	GGX(?)	Pro mit Poly-C	350	215	41

Die gleiche Tendenz zeigt sich in der Senkung der Akzeptoraktivität bei behandelter tRNS. Hier wird lediglich die Menge der an die tRNS gebundenen markierten Aminosäuren geprüft. Je größer der Anteil des Guanosins im Anticodon ist, desto geringer ist die Akzeptoraktivität (Tab. 11). Das Ergebnis spricht für eine Verknüpfung der Transfer- mit der Akzeptorfunktion (vgl. 2.1.1.).

Tab. 11: Die Einwirkung von NNMG auf die Akzeptoraktivität der tRNS

Aminosäure	Codon	Anticodon	Einbau der Aminosäure in die tRNS in IpM/mg tRNS (Kontrolle)	(+ NNMG)	% Hemmung
Lysin	AAA AAG	UUX(?)	25000	1000	60
Phenylalanin	UUU UUC	AAG^{OMe}	765	285	63
Serin	UCU UCC UCA UCG AGU AGC	AGI	850	160	81
Prolin	CCU CCC CCA CCG	GGX(?)	2050	310	85

Die dargelegten über die Proteinbiosynthese gewonnenen Ergebnisse (78) stimmen mit Resultaten von Singer und Fraenkel-Conrat (79) überein, die bei Tabakmosaikviren (TMV) gewonnen wurden. Die Autoren stellten fest, daß bei der Behandlung der Tabakmosaik-RNS (TMV-RNS) mit NNMG eine hohe Inaktivierung bei geringer Mutagenität vorliegt, während bei Behandlung der intakten Viren eine geringe Inaktivierung bei hoher Mutationsrate zu beobachten war. Diese geringe Inaktivierung der RNS in intakten Viren führen die Autoren auf eine günstige Lagerung der RNS-Kette im Proteinmantel zurück, die Guanin vor dem NNMG schützen soll. Es ist bekannt, daß Guanin im TMV auch von salpetriger Säure kaum angegriffen wird und Adenin relativ schwach reagiert. Die Konformation der RNS in den Viren (TMV) scheint für einen Angriff der Purine durch Mutagene ungünstig zu sein. Substitutionsprodukte des Guanins sollen gewöhnlich Letalität hervorrufen (80). Die Mutationsrate der NNMG-behandelten Viren erreicht nach Singer und Fraenkel-Conrat jedoch bei p_H 5,5 nur die Größenordnung der salpetrigen Säure und steht damit im Widerspruch zu der bei Organismen beobachteten hohen Mutationsrate des NNMG. Demnach werden in-vitro-Behandlungen von Nucleinsäuren bzw. TMV mit NNMG sowohl im zellfreien Proteinbiosynthesesystem als auch im TMV-System den Mutationen auslösenden Bedingungen in der lebenden Zelle nicht ganz gerecht.

2.2. Prüfung der durch NNMG veränderten DNS mit dem RNS-Polymerasesystem

Nach der Untersuchung des Einflusses der NNMG-Behandlung von Ribonucleinsäuren auf der Stufe der Translation war es von Interesse zu prüfen, wie sich eine Behandlung der DNS mit NNMG auf die Matrizenfunktion auswirkt. Diese Untersuchung ist sowohl mit Hilfe der Replikation mit dem System von Kornberg (81) als auch auf der Stufe der Transkription möglich.

2.2.1. Die Transkription

Hurwitz et al. (82) und Weiss et al. (83) stellten fest, daß eine RNS-Polymerase aus E. coli oder M. lysodeikticus in der Lage ist, in Gegenwart einer Starter-DNS und den vier Ribosidtriphosphaten neben gewissen Zusätzen, wie Magnesiumionen, eine RNS zu synthetisieren. Nimmt man vereinfachend die Basenderivate in gleicher Molmenge vorliegend an, so gilt die Gleichung:

$$\begin{matrix} \text{nATP} \\ \text{nUTP} \\ \text{nGTP} \\ \text{nCTP} \end{matrix} \xrightleftharpoons{\text{Starter-DNS, } Mg^{++}} \left[\begin{matrix} \text{AMP} \\ \text{UMP} \\ \text{GMP} \\ \text{CMP} \end{matrix}\right]_n + 4n\text{PP}$$

Nur der codogene Strang überträgt in vivo die Information (84, 85). Dies wird vermutlich in der Zelle durch das Lesen der Matrize in der Richtung möglich, in der der Strang als Matrize dient. Die Doppelhelix bleibt dabei wahrscheinlich erhalten (57), nur müssen die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen kurzfristig gelöst werden.

Zur Untersuchung des Einflusses des Mutagens NNMG auf die Transkription wurde von den jeweils zur RNS-Synthese erforderlichen vier Nucleosidtriphosphaten in einem Versuch markiertes ^{3}H-CTP und in einem weiteren ^{14}C-ATP verwendet. Als Starter diente eine mit NNMG behandelte Kalbsthymus-DNS. Wie Tab. 12 zeigt, ist die Hemmung der Matrizenaktivität umso stärker, je

Tab. 12: Wirkungen von NNMG auf die Starterfunktion der DNS in der RNS-Polymerase-Reaktion

Inkubationszeit mit 500γ/ml NNMG in Std.	Einbau von ^{3}H-CMP in IpM	in %	Einbau von ^{14}C-AMP in IpM	in %
0	1764	100	8889	100
3	994	56	5186	59
6	665	38	3834	43
12	467	27	2857	32
18	136	8	161	2

länger die DNS mit NNMG behandelt wird (86). Zwischen 12 und 18 Stunden langer Einwirkung des Mutagens ist ein starker Abfall des Nucleotideinbaus zu beobachten. Die DNS wurde offenbar so verändert, daß die Matrize nicht mehr gelesen werden kann. Die Versuche zeigen keinen merklichen Unterschied im Einbau der Nucleotide ^{3}H-CMP und ^{14}C-AMP in die RNS. Dagegen ließ sich bei der Proteinbiosynthese ein verschieden starker Einbau der Aminosäuren sehr wohl nachweisen (vgl. 2.1.3.).

2.2.2. Die Methylierung der DNS und die RNS-Synthesehemmung

Zur Erklärung der Einbauhemmung kann eine Alkylierung der Nucleinsäuren angenommen werden. Auf eine Alkylierung hatte die Code-Änderung der Polyuridylsäure nach Behandlung mit NNMG bereits hingewiesen (s. 2.1.3.). Wird die DNS mit ^{3}H-Methyl-NNMG unter sonst gleichen Bedingungen wie die Starter-DNS für die RNS-Synthese behandelt, ist eine Methylierung der DNS zu beobachten, die mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt (Tab. 13). Methylierung und RNS-Synthesehemmung laufen also weitgehend parallel (86). Vermutlich führt die Methylierung der DNS-Basen zu einer allgemeinen Hemmung der RNS-Synthese.

Tab. 13: Methylierung der DNS mit ^{3}H-Methyl-NNMG und Einbauhemmung von CMP und AMP als Funktion der Zeit

Inkubationszeit mit NNMG in Std.	Methylierung der DNS in 1p2OM/mg DNS	Einbauhemmung in % von ^{3}H-CMP	von ^{14}C-AMP
0	0	0	0
3	811	44	41
6	1357	62	57
12	1922	73	68
18	1669	92	98

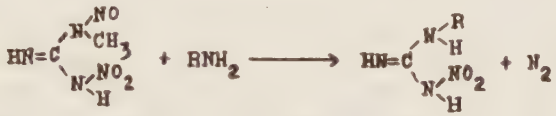
3. Chemische Reaktionen des NNMG, die zur Mutation führen können, und die Untersuchung der Methylierung der Nucleinsäuren in vitro und in vivo

3.1. Die Reaktion des NNMG im Hinblick auf die Mutagenese

Für die Mutationsauslösung durch NNMG sind drei Reaktionen mit den Nucleobasen zu erwägen (vgl. 1.1.1.). Es sind dies die Nitroguanylierung, die Methylierung und die Desaminierung.

3.1.1. Die Nitroguanylierung

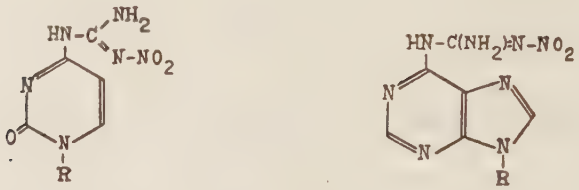
McKay (28) setzte NNMG in Ätherlösung mit Alkyl- und Arylaminen (RNH_2) um und wies dabei eine Nitroguanylierung unter Stickstoffentwicklung nach. Der Nitroguanylrest $-C(NH_2)=N-NO_2$ substituiert dabei ein Wasserstoffatom des Amins. Die Reaktion



(Formulierung nach McKay)

soll umso schneller erfolgen, je basischer das Amin ist. Von dieser Reaktion wurde zur Synthese des radioaktiv markierten NNMG Gebrauch gemacht, um durch milde Reaktionsbedingungen die Ausbeute zu erhöhen (Exper. Teil 1.1.). Da Adenin, Guanin und Cytosin ebenfalls Aminogruppen besitzen, ist bei einem Umsatz mit NNMG mit einer Nitroguanylierung dieser Basen zu rechnen. McCalla (87) gelang in jüngster Zeit mit Hilfe von ^{14}C-Guanidin-NNMG eine Umsetzung mit DNS, die aber nur 4% des Umsatzes erbrachte, der mit ^{14}C-Methyl-NNMG erzielt wurde. Sehr wahrscheinlich liegt hier eine Nitroguanylierung der Nucleobasen vor. Bei p_H 7 beobachtete der Autor ein allmähliches Verschwinden der Markierung. Dieser Effekt kann auf einer Abspaltung der entstandenen Basenderivate vom DNS-Ribose-phosphorsäureester-Rückgrat oder auf einer Abspaltung des Nitroguanylrestes beruhen. Der voluminöse Nitroguanylrest könnte an der Hemmung

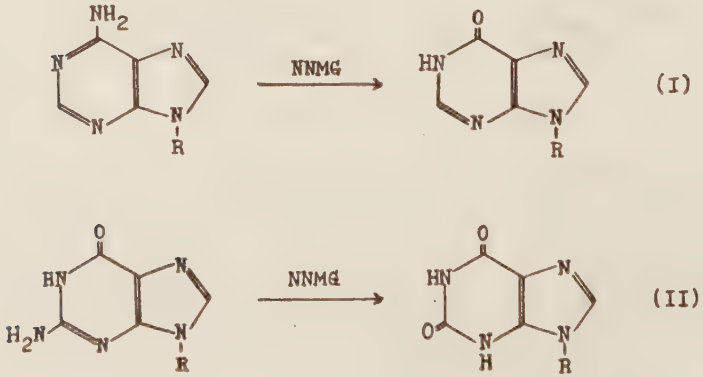
der Proteinbiosynthese, z.B. beim Cytosin, beteiligt sein.



Hypothetische Nitroguanylderivate des Cytosins und Adenins (nach Rau)

3.1.2. Die Desaminierung der Nucleobasen

Bei NNMG wurde die Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin (I) im stark sauren Bereich (55, 88) und sogar noch bei p_H 5,5 (78, 88) nachgewiesen. Eine Desaminierung des Guanins zu Xanthin (II) findet ebenfalls statt (88).



Die durch salpetrige Säure in der DNS bzw. RNS als Prämutation erzeugten Basenderivate müssen bei der Replikation durch zur Verfügung stehende natürliche Basen ersetzt werden. Der Ersatz durch eine falsche Base manifestiert die Mutation. So erwies

sich Hypoxanthin als durch Guanin ersetzbar (89). Nach Litman

$$A \xrightarrow{\text{chem. Veränderung}} (H) \xrightarrow{\text{Replikation}} G$$

(90) ist die Aminogruppe des Adenins in der DNS für salpetrige Säure noch leichter angreifbar als Cytosin, so daß dieser Reaktion auch in der Zelle Bedeutung zukommt.

Bei der Desaminierung des Guanins soll sich Xanthin wie Guanin verhalten:

$$G \xrightarrow{\text{chem. Veränderung}} (X) \xrightarrow{\text{Replikation}} G$$

Jedoch wird Xanthin weder in der enzymatischen DNS-Synthese in vitro in die DNS eingebaut (91), noch kann es G in der zellfreien Proteinbiosynthese vertreten (89). Eine Deutung ist schwierig, da die Bindungseigenschaften von Xanthin und Guanin ähnlich sind. Eine Synthesehemmung des Polyphenylalanins wurde aber von Basilio et al. (89) auch nach einer Behandlung von Poly-UA festgestellt, für die es keine Erklärung gibt. Vielmetter und Schuster (80) messen Desaminierungen des Guanins zur Erzeugung von Mutationen kaum eine Bedeutung bei. Sie sollen nur letal wirken, und zwar in den DNS-Bereichen, die eine genetische Information zur Synthese von Replikationsenzymen besitzen. Von den sechs damals nicht deutbaren Aminosäureaustauschen am Hüllenprotein des TMV (92), die durch salpetrige Säure verursacht wurden, können aber heute nach der Codon-Tabelle zwei als Transitionen G $\longrightarrow$ A gedeutet werden: Valin GUX, X = U, C, A, G nach Methionin AU^{A}_{G} und Arginin AG^{A}_{G} nach Lysin AA^{A}_{G}. Die Xanthin-Bildung kann schließlich auch an der Hemmung der Proteinbiosynthese mit NNMG-behandelten Polynucleotiden beteiligt sein.

3.1.3. Methylierungen durch NNMG

Die Methylierung als mutagene Reaktion kam wegen der leichten Bildung des Diazomethans aus NNMG von vornherein in Betracht. Sie wurde trotz Bedenken gegen einen Diazomethanmechanismus unter physiologischen Bedingungen angenommen, ohne nachgewiesen worden zu sein. Auf die Rolle dieser Methylierungsreaktion wies die enge Beziehung zwischen der DNS-Methylierung und der Matrizenaktivität der DNS nach der Behandlung mit NNMG hin (vgl. 2.2.2.).

3.2. Untersuchung der Methylierung in vitro

3.2.1. Die Methylierung der einzelnen Nucleinsäuren

Zur Untersuchung, ob die Synthesehemmungen der Polypeptide in der zellfreien Proteinbiosynthese sich auf eine Methylierung der Nucleinsäuren zurückführen lassen, wurden tRNS, Poly-A, Poly-C und Poly-U mit ^{3}H-Methyl-NNMG bei p_H 6 und 37° inkubiert. Nicht umgesetztes NNMG wurde säulenchromatographisch oder durch Dialyse gegen deion. Wasser von den Nucleinsäuren abgetrennt; die Ergebnisse sind ähnlich (Abb. 9 u. Tab. 14).

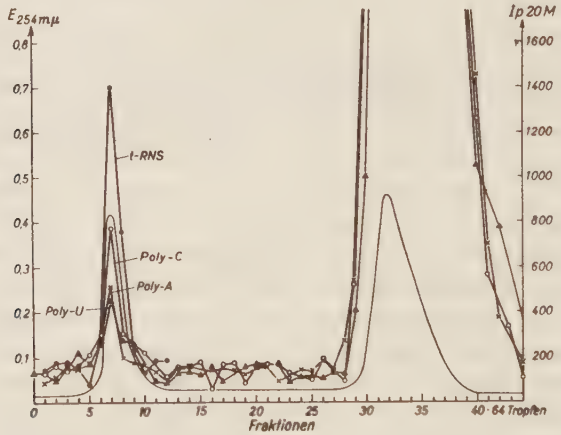


Abb. 9: Säulenchromatographische Trennung der methylierten Nucleinsäuren von ^{3}H-Methyl-NNMG. Die ausgezogene Linie gibt die Extinktion bei 254 nm an.

Da Polyuridylsäure zu 14%, Polyadenylsäure zu 16%, Polycytidylsäure zu 26% und alle vier Nucleotide der tRNS zu 44% an der Methylierung beteiligt sind, errechnen sich nach

$$x = \frac{100(4 \cdot 44 - (14+16+26))}{4 \cdot 44}$$

rund 70% für den Anteil der Guanylsäure bzw. des Guanins an der Gesamtmethylierung. Dabei ist eine gleiche prozentuale Beteiligung der Nucleotide am Aufbau der Ribonucleinsäuren vorausgesetzt.

Tab. 14: Methylierung der Nucleinsäuren mit 500 γ ^{3}H-Methyl-NNMG/1,25 ml bei p_H 6 und 37° nach 18 Stunden

Nucleinsäure	Ip2OM/mg RNS	Anteil an der Gesamtmethylierung in %
Transfer-RNS	7573	44
Polycytidylsäure	4388	26
Polyadenylsäure	2718	16
Polyuridylsäure	2448	14

Setzt man voraus, daß die Reihenfolge der Methylierungsstärke nicht durch eine Abspaltung methylierter Basen von den Nucleinsäuren zu stark verändert wurde, entspricht sie der Folge der Hemmung der Proteinbiosynthese (vgl. 2.1.3.). Die Hemmungen der Proteinsynthese können also auf Methylierungen der Polynucleotide beruhen. Mit dieser Deutung stimmen die Ergebnisse von Wilhelm und Ludlum (93) überein. Sie fanden, daß 7-Methylguanin in Poly-UG bei der Polypeptidsynthese in vitro eine bedeutende Senkung der Matrizenaktivität hervorruft. Die Autoren führten sie auf sterische Effekte des 7-Methylguanins in der RNS zurück, die sich in verschiedener Weise äußern könnten, z.B. in einer Störung der Bindung der Matrize an die Ribosomen. Das Methylderivat des Cytosins 5-Methylcytosin scheint dagegen keinen Hemmeffekt auszuüben (91). Auch war die DNS aus T2-Phagen in ihrer Matrizenfunktion keineswegs beeinträchtigt, wenn Cytosin durch 5-Hydroxymethylcytosin vertreten wurde (91).

3.2.2. Die Methylierung als Funktion der Zeit und des p_H-Wertes

Tab. 15 zeigt eine Methylierungskinetik der tRNS. Es ist nur eine langsame Methylierung zu erkennen, und der Zuwachs der Methylierung verringert sich stetig. Nach 32 Stunden ist die Reaktion noch nicht beendet.

Tab. 15: Methylierung der tRNS mit 500γ ^{3}H-Methyl-NNMG pro 1,25 ml Puffer in Abhängigkeit von der Zeit bei p_H 6 und 37°

Zeit in Std.	0,5	1	2	4	8	16	32
Methylierung der tRNS in Ip20M/mg tRNS	405	788	1356	2144	3630	5840	10060

Die Methylierung der Nucleinsäuren als Funktion des p_H-Wertes zeigt (Abb. 10), daß erst bei p_H 5,5 die Methylierung stärker zu werden beginnt und dann mit anwachsender Hydroxylionenkonzentration ansteigt. Bemerkenswert ist die stärkere Methylierung der tRNS gegenüber der DNS. Sie beruht wohl auf der Struktur der RNS und der freien Hydroxylgruppe der Ribose. Eine Methylierung der Nucleinsäuren mit 1-Nitro-3-methyl-guanidin war nicht nachzuweisen.

3.2.3. Die Methylierung der Phosphorsäurediester in den Nucleinsäuren

Neben einer Methylierung der Nucleobasen ist auch die Methylierung der Phosphorsäurediester zu erwägen. Nach Reiner und Zamenhof (94) reagieren alkylierende Substanzen mit der DNS unter Triphosphorsäureester-Bildung besonders intensiv. Alexander et al. (95) untersuchten das Verhalten der DNS nach Behandlung mit einem Stickstoff-Lost ($(CH_3)_2NCH_2CH_2Cl$) und Methansulfonsäuremethylester und stellten dabei einen DNS-Abbau beim Stehenlassen fest. Sie führten ihn auf einen Verlust methylierter Purine zurück, die infolge einer Transmethylierung durch primär gebildete Triphosphorsäureester entstanden sein sollen. Da diese Transalkylierung bei äthylierenden Mutagenen fehlen soll, schrieben sie die stärkere mutagene Wirkung dieser Agenzien der Triester-Bildung zu.

Heute dagegen sieht man mit Freese (96) in der Triphosphorsäureester-Bildung eine Ursache für letale Wirkungen, während

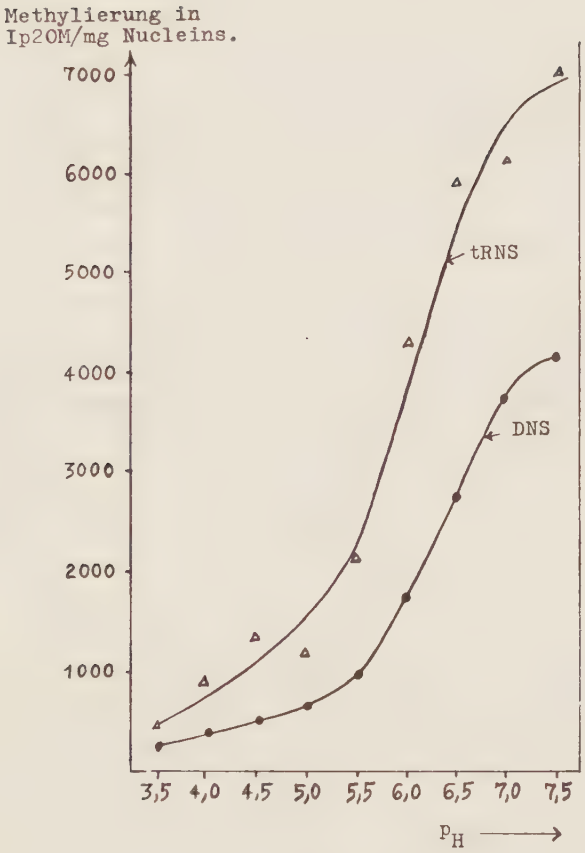


Abb. 10: Methylierung der tRNS und DNS mit 500γ ^{3}H-Methyl-NNMG pro 1,25 ml Puffer in Abhängigkeit vom p_H-Wert nach 12 Stunden

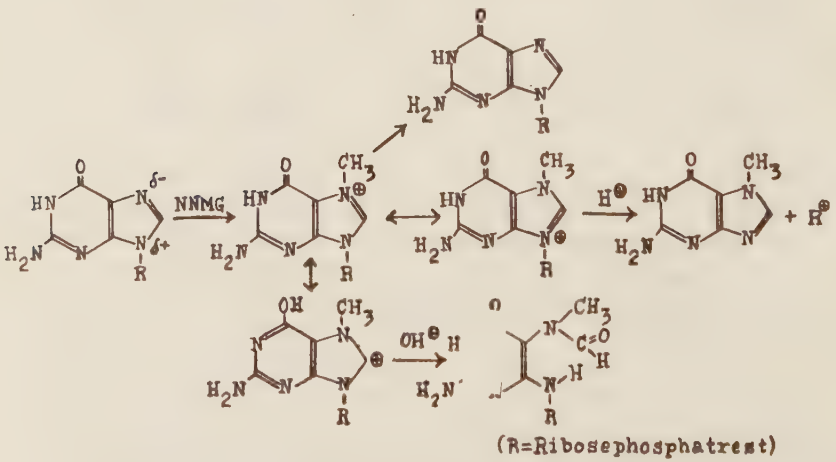
man der Alkylierung der Basen die Hauptursache für die Mutationsauslösung zuerkennt. Die von McCalla gefundene Senkung der Methylierungsrate von Nucleinsäuren mit NNMG in Gegenwart von Phosphatpuffer (87) wird durch die Annahme einer Bildung der Methylester verständlich.

3.3. Methylderivate der Nucleobasen bei der Reaktion mit NNMG

Zur Untersuchung der Methylderivate der Nucleobasen wurden synthetische Nucleinsäuren und Nucleobasen bei p_H 6 und 37° mit ^{14}C-Methyl-NNMG umgesetzt und Methylierungsprodukte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gesucht. Die nucleophilen Zentren der Basen werden von den methylierenden Agenzien angegriffen.

3.3.1. Die Methylierung des Guanins in Poly-UG

In einem Mischkondensat von Polyguanyl- und Polyuridylsäure gelang auf diese Weise der Nachweis von 7-Methylguanin in mehreren Laufsystemen. Die Reaktionen der 7-Methylguanylsäure sind bekannt. Falls die Methylgruppe nicht wieder ab-

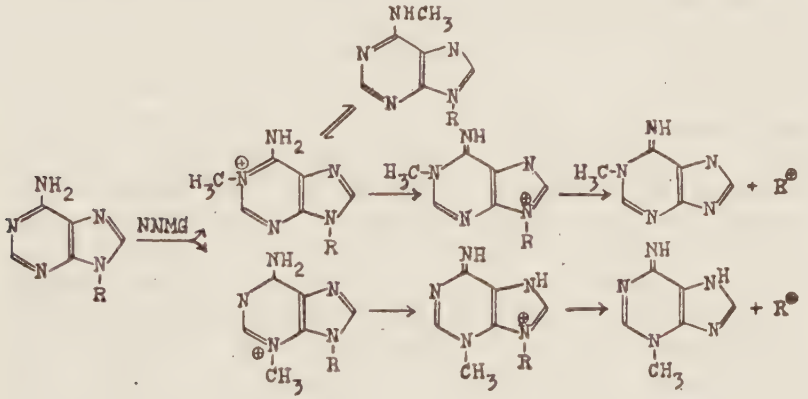


gespalten wird, kann sich 7-Methylguanin vom Ribosephosphatgerüst lösen (97). Nach Warwick (22) kann auch im alkalischen Milieu die bei p_H 7 stabile Methylverbindung zunächst in ein Aldehydderivat umgewandelt werden, bei dem sich ebenfalls die N-Glycosidbindung spalten läßt.

3.3.2. Die Methylierungsprodukte des Adenins und der Polyadenylsäure

Die Produkte der Reaktion von ^{14}C-Methyl-NNMG mit Adenin lassen eine recht unspezifische Methylierung erkennen. Es konnten die Derivate 1-Methyladenin, 3-Methyladenin und in geringen Mengen N^6-Methyladenin gefunden werden. Nach Lawley und Brookes geht N^6-Methyladenin auch durch eine Wanderung der Methylgruppe aus 1-Methyladenin besonders bei neutralem p_H-Wert hervor (97).

Die Umsetzung der Polyadenylsäure mit dem radioaktiven NNMG ergab die gleichen Methylierungsprodukte. N^6-Methyladenin war nur in Spuren zu finden. Die Wanderung der Methylgruppe des 1-Methyladenins soll mit zunehmender Wasserstoffionen-Konzentration durch eine andere Reaktion verdrängt werden können, die in einer Abspaltung dieser Nucleobase vom Ribosephosphatgerüst besteht (97). Eine Abspaltung des 3-Methyladenins im neutralen Bereich ist ebenfalls bekannt (97).

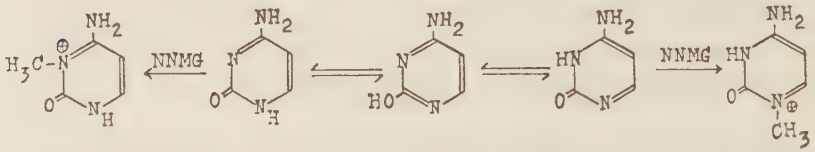


(R = Ribosephosphatrest)

Die hier bei der Umsetzung von markiertem NNMG mit Ribonucleinsäuren bzw. Nucleobasen festgestellten Verbindungen, 7-Methylguanin, 1- und 3-Methyladenin, wurden ebenfalls bei der Umsetzung der Nucleoside und Nucleotide mit NNMG von Rau und Lingens nachgewiesen (98).

3.3.3. Die Methylierungsprodukte des Cytosins und der Polycytidylsäure

Die Reaktion des Cytosins mit ^{14}C-Methyl-NNMG führte zu 1-Methylcytosin und 3-Methylcytosin. Das für die Mutationsauslösung in Frage kommende 1-Methyl-Derivat ließ sich auch bei



der Umsetzung des markierten NNMG mit Polycytidylsäure feststellen.

3.3.4. Besonderheiten der Methylierung der DNS und RNS

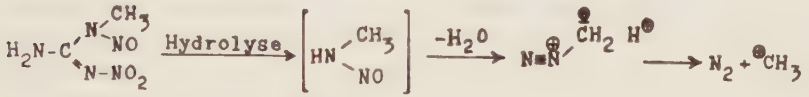
Methylierende Agenzien bilden mit der DNS nach Versuchen von Lawley und Brookes (97) annähernd die gleichen Methylierungsprodukte wie die RNS, wobei geringe Differenzen in der Häufigkeit auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen sind. Nur in denaturierter DNS sind die 1-Positionen des Adenins und des Cytosins zugänglich, die sonst durch Wasserstoffbrücken-Bindungen blockiert sind (97), wie aus dem Watson-Crick-Modell folgt. In der RNS ist die 3-Stellung des Adenins (99) durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit der 2'-Stellung der Ribose maskiert, so daß die Bildung des 1-Methyladenins begünstigt ist. Die stärkere dreifache Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Guanin und Cytosin gegenüber der schwächeren doppelten zwischen Adenin und Thymin erklärt, weshalb 1-Methylcytosin im Gegensatz zu 1-Methyladenin in der DNS in geringerem Maße vertreten ist.

3.4. Der Reaktionsmechanismus der Methylierung

3.4.1. Der Mechanismus der Nitrosamide über Diazomethan

Nach dem Schema von Magee, Farber, Heath und Druckrey (100, 101) wird als Methylierungsmechanismus für die Nitrosamide primär die

Bildung eines instabilen Monoalkylnitrosamins durch eine Hydrolyse im neutralen und alkalischen Bereich angenommen. Dieses soll spontan in ein Diazoalkan zerfallen, das unter Stickstoffentwicklung als alkylierendes Agens ein Carbeniumion freisetzt. Auf NNMG angewendet, ergibt sich folgendes Schema:



Monomethyl-
nitrosamin

Die Möglichkeit einer Methylierung über Diazomethan muß wohl skeptisch beurteilt werden, da vor allem unter p_H 10 kein Diazomethan mehr nachweisbar ist. Es ist allerdings von Meerwein eine alkoholytische Spaltung von N-Nitroso-N-methylurethan bei 0^o in Gegenwart von in Alkohol unlöslichen Katalysatoren, wie K_2CO_3, Na_2CO_3 und Magnesiumäthylat, bekannt (102). Hierbei soll in neutralem Medium "nascierendes Diazomethan" entstehen, das eine direkte Behandlung der Aldehyde ohne Verharzung durch Alkali erlaubt.

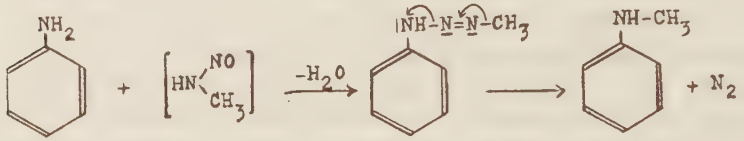
Das in dem Schema postulierte labile Monomethylnitrosamin ist bekannt. Eugen Müller und Mitarbeiter (103) fanden es als Primärprodukt mit Hilfe der UV-Spektroskopie bei tiefen Temperaturen in einem Reaktionsgemisch aus Methylamin, Nitrosylchlorid und Kaliumäthylat in ätherischer Lösung. Aus dieser wurde schließlich das beständige Kaliummethyldiazotat (CH_3-N=N-OK) als "stabilisiertes Diazomethan" erhalten.

Kriek und Emmelot (99) gelang es, Methylierungsprodukte auch aus einer Reaktion von Diazomethan mit Lachsspermatozoen-DNS nachzuweisen. Sie erhielten 7-Methylguanin und 3-Methyladenin. In mit NNMG umgesetzter RNS aus Hefe fanden sie 1-Methylcytosin. Auch stellten sie in den Nucleinsäuren eine Veresterung der Phosphatgruppen fest. Da diese Methylderivate auch bei Reaktionen mit NNMG gefunden wurden (vgl. 3.3.), kann man

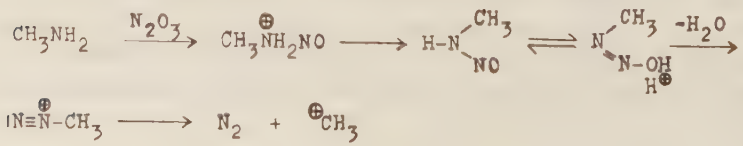
hieraus auf keinen anderen Reaktionsmechanismus für NNMG schließen.

3.4.2. Nicht über Diazomethan führende Methylierungsmechanismen

McKay entwickelte in wässeriger Kalilauge aus NNMG Diazomethan und erhielt bei Zusatz von Anilin N-Methylanilin (29). Henry wies jedoch darauf hin, daß unter diesen Bedingungen Diazomethan Anilin nicht methylieren könne (104). Er formulierte daher eine Methylierung über das 1-Methyl-3-phenyl-triazen bzw. über das isomere 3-Methyl-1-phenyl-triazen mit Hilfe des Methylnitrosamins, das bei der Nitroguanylierung von Alkyl- und Arylverbindungen durch NNMG entsteht.

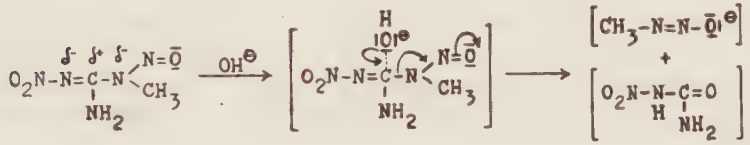


Eine andere Möglichkeit, die Bildung von Diazomethan als methylierendem Agens zu umgehen, eröffnen Versuche von Kriek und Emmelot (99). Sie stellten nach Einwirkung eines Gemisches von Methylamin und salpetriger Säure auf die DNS bei p_H 4,0 7-Methylguanin fest. In vivo gelang es jedoch in eigenen Versuchen mit S. cerevisiae E 188 ad$^-$ (rot) nicht, mit einem solchen Gemisch eine merkliche Erhöhung der Mutationsrate zu erhalten. Nach Austin (105) entsteht in dieser Reaktion primär das Monomethylnitrosamin aus Methylamin und Distickstofftrioxid, das seinerseits aus salpetriger Säure gebildet wird. Das tautomere Umlagerungsprodukt des Methylnitrosamins, das Methyldiazohydroxyd, wird schnell zum Methyldiazonium-Kation ionisiert, aus dem unter Stickstoffabspaltung das elektrophile Carbeniumion als methylierendes Agens hervorgeht.



3.4.3. Eine Hypothese für den Methylierungsmechanismus von NNMG

Bei der Diazomethan-Gewinnung aus Nitrosoacylaminen in alkalischer Lösung (106) wird eine Ablösung der Acylgruppe durch die Base unter Bildung eines Methyldiazotats angenommen. Bei N-Nitroso-N-methyl-urethan ist der Angriffsort das C-Atom der Carbonylgruppe. Für NNMG tritt an diese Stelle das C-Atom des Guanidins:



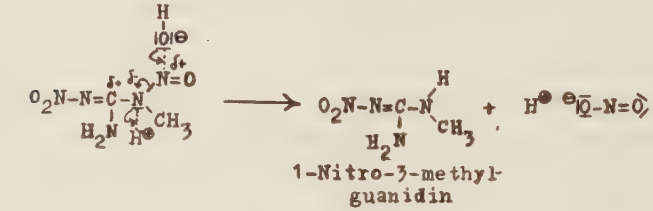
I

Würde nach W. Kirmse et al. (106) die Base auch bei NNMG an der Aminogruppe angreifen, so gilt:

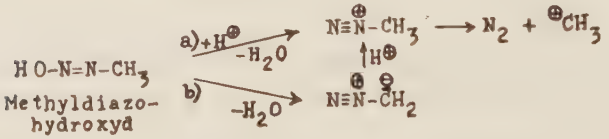
In beiden Fällen wird ein Diazotat gebildet, aus dem das Diazomethan entstehen kann.

Die Mitwirkung der Hydroxylionen ist für den ersten Reaktionsschritt auch für die Methylierung der Nucleinsäuren durch NNMG in neutralem und schwach saurem Milieu plausibel. Die p_H-Abhängigkeit der Methylierung zeigt bei p_H 5,5 eine merkliche Methylierung, die mit zunehmender Hydroxylionen-Konzentration rasch ansteigt. Die Methylierungskurve und die Stabilitätskurve des NNMG zeigen einen ganz verschiedenen Verlauf, der wahrscheinlich auf der Konkurrenz zweier Reaktionen, vornehmlich für $p_H \geq 5$, beruht. Die eine Reaktion bedingt die Bildung des methylierenden Agens über Methyldiazohydroxyd bzw. Methyldiazotat (I). Daneben tritt Nitro-harnstoff auf (NO_2-$NHCONH_2$),

der nicht gefaßt werden kann. Die andere Reaktion führt zum 1-Nitro-3-methyl-guanidin und zur salpetrigen Säure bzw. Nitrit (II). Beide Reaktionen sind verständlich, da das NNMG-Molekül Hydroxylionen elektrophile Angriffspunkte am Guanidin-C-Atom und am N-Atom der Nitrosogruppe bietet. Nach der p_H-Abhängigkeit der Stabilität des NNMG (s. 1.3.2.) kommt für $p_H<5$ auch ein elektrophiler Angriff eines H^+ in Frage.

II 

Die Bildung des Methyldiazohydroxyds bzw. Methyldiazotats nehmen auch P. Emmelot et al. (107) als Zwischenprodukt bei der Methylierung durch N-Nitroso-N-methyl-urethan an, aus dem das methylierende Agens gebildet wird:



Da bei NNMG ein Reaktionsmechanismus über Diazomethan unwahrscheinlich ist, trifft vermutlich in Übereinstimmung mit Austin (105) vor allem im sauren und neutralen p_H-Bereich Reaktion a zu, nach der Methyldiazohydroxyd mit Wasserstoffionen reagiert. Hierbei entsteht das Methyldiazoniumion. Aus diesem kann unter Stickstoffabspaltung das elektrophile Methylkation freigesetzt werden. Da man Diazomethan aus NNMG im alkalischen p_H-Bereich erhält, ist hier Reaktion b anzunehmen, die wohl Reaktion a mit ansteigendem p_H-Wert immer mehr verdrängt.

3.5. Nachweis der Methylierung durch NNMG in vivo

Die Methylierung in vitro zeigt im NNMG-Aufnahme- und Mutationsoptimum bei p_H 6 nur eine geringe Intensität. Vielleicht ist gerade in der schwachen, aber spezifischen Reaktivität des NNMG die starke mutagene Wirkung zu suchen, wofür die geringe Abtötung spräche. Zum Nachweis der Methylierung in vivo wurden E. coli-Bakterien zunächst im Komplettmedium unter Zusatz von ^{3}H-Methyl-NNMG inkubiert. Die Auftrennung des Bakterienextraktes in Protein- und Nucleinsäurefraktionen erfolgte im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten. Abb. 11 zeigt, daß bereits nach zweistündiger Inkubation eine Markierung der DNS und RNS zu beobachten ist, die sich nach drei weiteren Stunden verstärkt hat. Das Protein weist ebenfalls eine Markierung auf.

Auch bei ruhenden Bakterien in Pufferlösung wurde eine Methylierung der Nucleinsäuren und eine Markierung des Proteins nach zweistündiger Inkubation mit ^{3}H-Methyl-NNMG gefunden (Tab. 16). Eine Methylierung von der Aktivität $2 \cdot 10^3$ Ip20M/mg DNS ist in

Tab. 16: Methylierung der Nucleinsäuren und des Proteins von E. coli B nach zweistündiger Inkubation mit 20 γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml bei 37° und p_H 6

Fraktionen	RNS I	II	III	DNS IV	V	VI	VII	Protein VIII
E_{260}	1,286	0,492	0,320	1,165	0,351	0,145	0,148	0,326
Ip20M	555	215	165	512	125	74	43	342
E_{280}	0,46			0,53				1,2
E_{260}								
Ip20M/mg	$2,3 \cdot 10^3$			$2,0 \cdot 10^3$				

vitro bei dem gleichen p_H-Wert erst nach ca. 10 Stunden mit 25facher NNMG-Konzentration festzustellen. Da sehr wahrscheinlich ein Teil der Methylgruppen in den Stoffwechsel eingeht, ist hierbei ein Markierungsuntergrund zu berücksichtigen, der nicht auf einer Methylierung der Nucleobasen beruht.

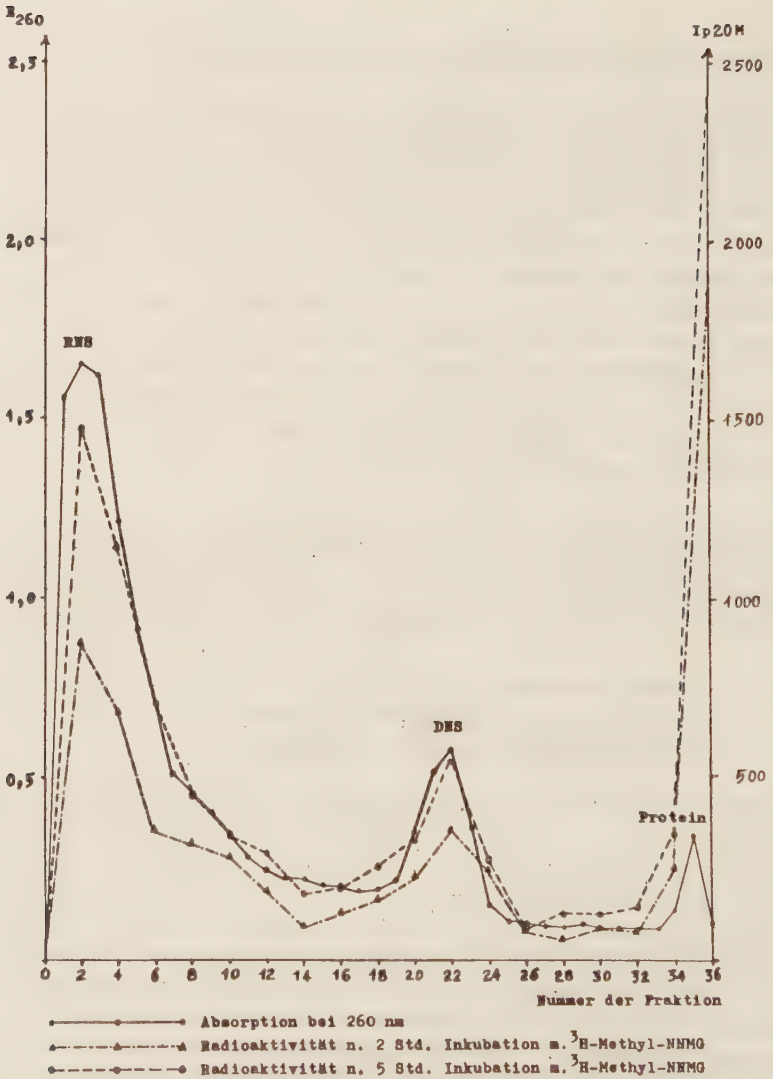


Abb. 11: Markierung der Nucleinsäuren und des Proteins von E. coli B-Bakterien, die mit 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml bei p_H 6 und 37° im Hefeextrakt-Glucose-Medium inkubiert wurden

4. Untersuchungen der Inaktivierung und Resistenzausbildung durch NNMG

4.1. DNS- und RNS-Synthesehemmungen durch NNMG in der Zelle

Die Wirkungen von NNMG auf die Nucleinsäuresynthesen bei Bakterien wurde am Einbau von ^{3}H-Uracil verfolgt. Es ist bekannt, daß die Nucleobase Uracil im Desoxyuridin-5'-phosphat durch N^5, N^{10}-Methylentetrahydrofolsäure zu Thymidindesoxy-5'-phosphat methyliert (57, 108, 109) und in die DNS eingebaut wird. Die Abb. 12 zeigt, daß nach zweistündiger Behandlung mit NNMG die DNS-Synthese fast völlig ausgeschaltet ist und nach 5stündiger Behandlung noch nicht den Umfang erreicht hat, der bei unbehandelten Bakterien nach zwei Stunden festzustellen ist. Die RNS-Synthese liegt nach zweistündiger Inkubation in dem NNMG-haltigen Medium um 50% unter der des Kontrollversuchs und hat nach 5 Stunden erst das Ausmaß erreicht, das unbehandelte Bakterien bereits nach zwei Stunden aufweisen. Das Protein ist nicht markiert. Wie Tab. 17 zu entnehmen ist, beträgt die Ver-

Tab. 17: ^{3}H-Uracileinbau in die Nucleinsäuren von behandelten und unbehandelten E. coli-Bakterien nach 5 Stunden

	Uracileinbau in 2 · 10^3 IpM/mg Nucleinsäure				Verringerung des Uracileinbaus in %
	unbehandelt		mit 30 γ NNMG/ml behandelt		
	Einzelfrakt.	Mittel	Einzelfrakt.	Mittel	
RNS	8,6		6,8		
	8,2	9,1	6,5	6,7	27
	10,6		6,8		
DNS	9,6		5,0		
	9,7	9,1	4,1	4,4	52
	8,0		4,0		

ringerung der Nucleinsäuresynthesen gegenüber unbehandelten Bakterien bei der RNS ca. 30% und bei der DNS 50%. Mit ganz anderen Methoden erzielten Terawaki et al. ähnliche Ergebnisse (41). Sol-

che Hemmungseffekte der Nucleinsäuresynthesen sind auch bei Versuchen mit Senfgas entdeckt worden (25). Ebenfalls wurde die DNS-Synthese stärker als die RNS-Synthese gehemmt.

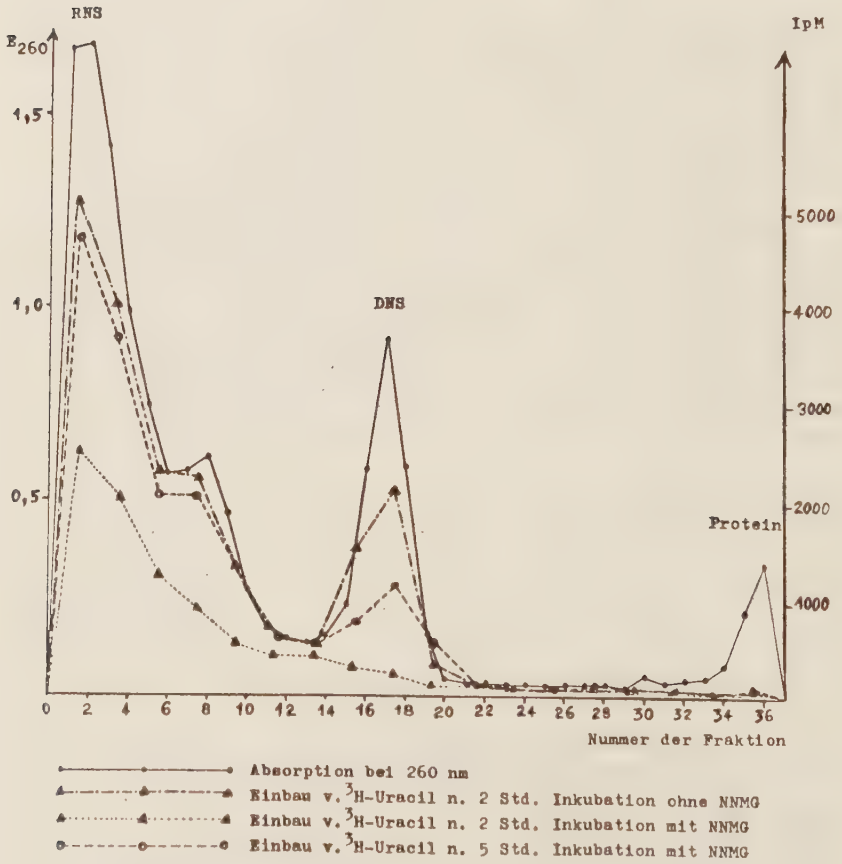


Abb. 12: ^{3}H-Uracileinbau in die Nucleinsäuren von E. coli-Bakterien bei Inkubation im Hefeextrakt-Glucose-Medium, p_H 6 und 37°. NNMG-Zusatz bei behandelten Bakterien: 30 γ/ml

4.2. Die Hemmung der zellfreien Proteinbiosynthese mit Extrakten aus NNMG-behandelten Bakterienzellen

Als Ursache der Hemmung sind außer Veränderungen der Nucleinsäuren Schädigungen der Enzyme und die Inaktivierung der Ribosomen zu erörtern, an denen die Syntheseenzyme produziert werden. Daher wurde die zellfreie Proteinbiosynthese mit Zellfraktionen NNMG-behandelter E. coli-Bakterien untersucht. Tab. 18 zeigt eine Verringerung des Aminosäureeinbaus, wenn Zellfraktionen aus NNMG-behandelten Bakterien verwendet wurden. Um zu prüfen, ob diese Synthesehemmung auf eine Inaktivierung

Tab. 18: Proteinbiosynthese mit Zellfraktionen unbehandelter und mit 30 γ NNMG/ml behandelter E. coli-Bakterien

Ribosomen-fraktion	Enzym-fraktion	Einbau von Lysin nach 10 Minuten in IpM	in %	nach 20 Minuten in IpM	in %
unbehdlt.	unbehdlt.	1346	100	940	100
behdlt.	behdlt.	924	69	502	53
behdlt.	unbehdlt.	786	59	305	32
unbehdlt.	behdlt.	2001	149	1724	184

der Ribosomen zurückzuführen ist, wurden die Ribosomen- und Enzymfraktionen der unbehandelten und NNMG-behandelten Bakterien ausgetauscht. Aus der verminderten Proteinbiosynthese mit Ribosomenfraktionen aus behandelten Zellen (Tab. 18) folgt, daß die Einbauhemmung auf der Inaktivierung der Ribosomen beruht. Für diese kann eine Zerstörung der Ribosomen-RNS durch NNMG verantwortlich sein.

4.3. Die Inaktivierung der Ribosomen nach Behandlung der Bakterienzellen mit NNMG

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die RNS aus NNMG-behandelten und nicht behandelten Bakterien isoliert und der Saccharose-Gradientenzentrifugation unterworfen. Abb. 13 zeigt einen Ex-

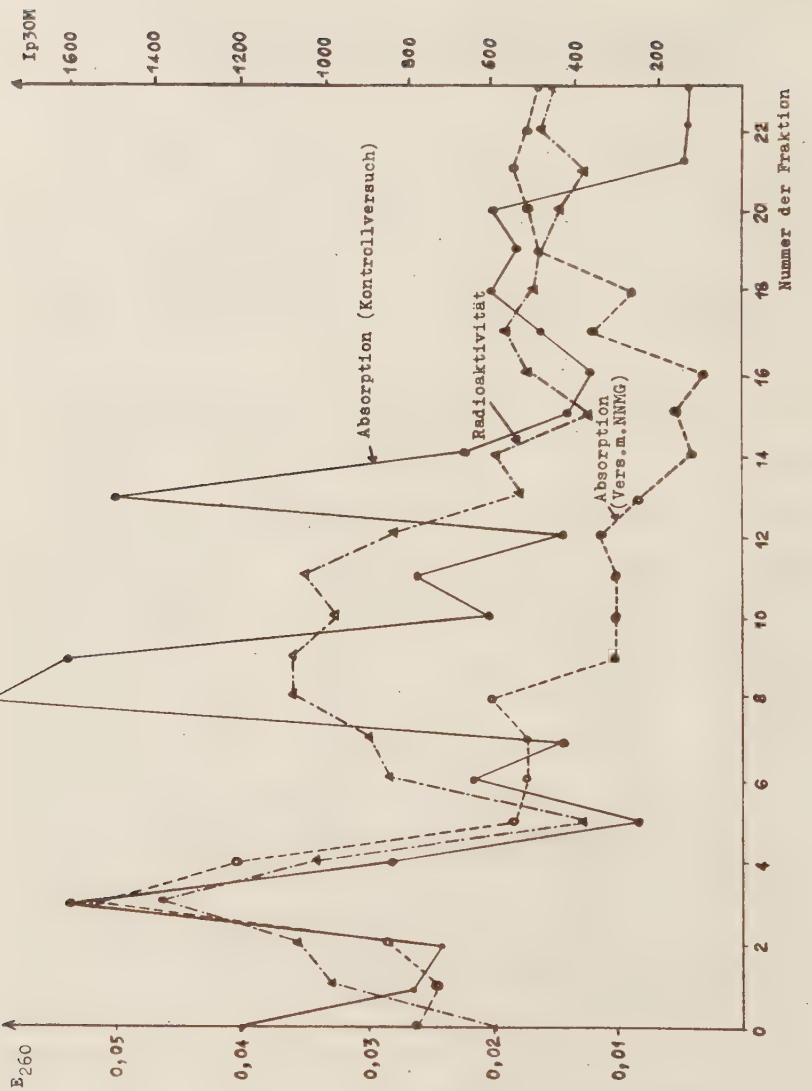


Abb. 13: Fraktionen der RNS aus NNMG-behandelten und unbehandelten Bakterienzellen von E. coli B, die einer Saccharose-Gradientenzentrifugation unterworfen wurden.

tinktionsabfall und eine relativ starke radioaktive Markierung der leichteren Fraktionen der Ribosomen-RNS (Frakt. 7 - 12) aus NNMG-behandelten Bakterien gegenüber den Kontrollversuchen. Diese RNS-Fraktionen lassen sich den 30-S-Ribosomen zuordnen. Da an ihnen die mRNS als Matrize bei der Proteinbiosynthese fungiert, kann die Inaktivierung der Ribosomen auf die Methylierungen und die damit verbundenen Schäden der Ribosomen-RNS zurückgeführt werden. Die 30-S-Ribosomen wurden von Cox et al. (110) für Resistenz und Empfindlichkeit gegen Streptomycin verantwortlich gemacht.

Nach Krieck und Emmelot (111) führt die Methylierung der RNS zur Instabilität der RNS im neutralen p_H-Bereich. Nach Brookes und Lawley (112) soll dagegen alkylierte RNS in neutralem Medium stabil sein. Wie bereits erwähnt (vgl. 3.1.3.), fanden Wilhelm und Ludlum (93), daß die Methylierung von Polyuridylsäure die Matrizenaktivität beträchtlich senken kann. Die Versuche im zellfreien Proteinsynthesesystem (s. 2.1.3.) erbrachten ebenfalls eine Einbauhemmung der Aminosäuren nach Behandlung synthetischer Nucleinsäuren mit NNMG. Diese Synthesehemmungen und die Inaktivierung der Ribosomen können auf ähnliche Ursachen zurückgeführt werden.

4.4. Untersuchung der Ursachen der Resistenzausbildung bei E. coli B

Die Frage der Resistenzausbildung trat bereits bei der Untersuchung der Inaktivierung auf (s. 1.3.1.). Die Ursache einer Resistenz wird u.a. in einer herabgesetzten Durchlässigkeit des Hemmstoffes durch die Zellmembran, in einer Zunahme der Aktivität des gehemmten Enzyms oder in einem gesteigerten Abbau des Hemmstoffes gesehen (57).

Ein Vergleich des Wachstums von Bakterienpopulationen im Komplettmedium zeigt in Tab. 19 (I u. II), daß die vorbehandelten Zellen gegenüber nicht vorbehandelten nicht merklich gehemmt sind. Bei Zusatz von NNMG (III u. IV) ist bereits nach 12 Stunden eine Zunahme der Zelldichte der vorbehandelten Bakterien gegenüber dem Kontrollversuch zu erkennen. Die NNMG-Aufnahme

liegt bei vorbehandelten Zellen um über 50% unter der des Kontrollversuchs. Wenn das Medium NNMG enthält, ermöglicht die Vorbehandlung offensichtlich einen rascheren Übergang des

Tab. 19: Wachstum und NNMG-Aufnahme von E. coli-Populationen mit und ohne Vorbehandlung mit NNMG (30 γ/ml) bei p_H 6 und 37° im Hefeextrakt-Glucose-Medium

I. Zelldichte der unbehandelten Bakterien im Kulturmedium ohne NNMG

II. Zelldichte der Bakterien, die 32 Stunden mit NNMG vorbehandelt wurden

III. Zelldichte und NNMG-Aufnahme der unbehandelten Bakterien mit NNMG

IV. Zelldichte und NNMG-Aufnahme der Bakterien, vorbehandelt wie II, im Kulturmedium mit NNMG

Zeit in Std.	$E_{Trübung}$ (Eppendorf)				Aufnahme von ^{3}H-Methyl-NNMG in Ip10M/OE	
	I	II	III	IV	III	IV
0	0,86	0,86	0,86	0,86	-	-
0,5	0,87	0,95	-	-	-	-
1	1,19	1,27	0,86	0,86	3890	1830
2	1,44	1,45	0,87	0,85	5540	2420
3	1,58	1,47	-	-	-	-
4	-	-	0,87	0,90	4740	2130
8	1,66	1,55	0,86	0,86	5840	2500
12	-	-	0,85	0,93	6660	1920
16	-	-	0,83	1,51	6460	1005
32	-	-	1,35	1,84	3170	817

Wachstums in die logarithmische Phase. Während bei den vorbehandelten Bakterien die NNMG-Aufnahme nach etwa 8 Stunden sinkt, dauert sie bei den nicht vorbehandelten länger an.

Eine Prüfung der Mutationsrate, Abtötung, NNMG-Aufnahme und Methylierung der DNS in vivo wurde auch mit ruhenden NNMG-sensitiven und -resistenten Zellen in Pufferlösung bei p_H 6 vorgenommen. Wie aus Tab. 20 hervorgeht, werden unter den gleichen Bedingungen unbehandelte Bakterien nach vierstündiger Inkubation mit ^{3}H-Methyl-NNMG bis auf 2% Überlebende abgetötet, während eine zweimalige Behandlung mit NNMG nur eine Abtötung

Tab. 20: NNMG-Aufnahme, Inaktivierung, Mutationsrate und Methylierung der Nucleinsäuren bei NNMG-sensitiven und -resistenten E. coli-Bakterien. Vierstündige Behandlung mit ^{3}H-Methyl-NNMG in Citronensäure-Phosphat-Puffer von p_H 6

Vorbehandlung der Bakterien mit 30γ NNMG/ml	Überlebende in %	Mutationsrate in %	NNMG-Aufnahme in %	Methyl. der Nucleins. in % RNS	DNS
-	2,0	11,7	100)+	100)+	100)+
32 Std.	26,2	5,2	83	74	81
2·32 Std.	53,7	3,7	50	58	57

auf 54% Überlebende ergibt. Auch Mutationsrate und NNMG-Aufnahme sinken mit der Anzahl der Vorbehandlungen mit NNMG. Der Verringerung der NNMG-Aufnahme bei den resistenten Zellen entspricht eine ebensolche Verringerung der Methylierung der Nucleinsäuren (Tab. 20).

Aus den dargelegten Versuchen kann man schließen, daß die Resistenzausbildung im wesentlichen auf einer herabgesetzten Aufnahme des Mutagens beruht und nicht auf einer verstärkten Inaktivierung des NNMG in der Zelle. Ähnliche Ergebnisse gewann Hirono mit alkylierenden Cancerogenen bei Tumorgeweben (113, zit. n. 57).

)+ NNMG-Aufnahme und Methylierung der Nucleinsäuren willkürlich 100% gesetzt

5. Die Methylierung der Nucleinsäuren in der Zelle und die Aktivierung der Methylierung in vitro durch Sulfhydrylverbindungen

5.1. Die Frage der enzymatischen Aktivierung des NNMG bei der Methylierung in der Zelle

Dialkylnitrosamine wirken nur mutagen und cancerogen, wenn der Organismus über die Fähigkeit verfügt, nach enzymatischer Oxydation die Diazoalkane als reaktive Form freizusetzen. So konnte bei Neurospora crassa keine Mutagenität festgestellt werden, da das entsprechende Enzym fehlt (114, 115).

Nach Versuchen von Druckrey et al. (34) wurden in Ratten bei subcutaner Injektion auch hoher Dosen von Dialkylnitrosaminen nie lokale Sarkome gefunden. Sie traten immer nur in entlegenen Organen auf, weil nach dem Autor aus der unwirksamen "Transportform" erst enzymatisch die "Wirkform" gebildet werden muß. Demgegenüber wird eine mutagene Wirkung der Nitrosamide, einschließlich NNMG, bei allen bisher untersuchten Organismen, auch bei Neurospora crassa (45), beschrieben. Im Gegensatz zu den Dialkylaminen bilden die Nitrosamide nach Druckrey et al. (34) lokale Sarkome an der subcutanen Injektionsstelle. Die Autoren folgern hieraus, daß Nitrosamide keiner enzymatischen Aktivierung bedürfen und daher schon an der Injektionsstelle als dem Ort höchster Konzentration des Cancerogens Geschwülste bilden.

Marquardt und Mitarbeiter (51) schließen auf eine enzymatische Reaktion bei der Mutationsauslösung, weil Stabilität, Wasserlöslichkeit und Anzahl der Alkylgruppen bei verschiedenen Nitrosaminen die Mutagenitätsunterschiede nicht deuten können.

Singer und Fraenkel-Conrat (79) erhielten mit NNMG bei TMV eine relativ geringe Mutationsrate. Da diese bei p_H 5,5 nur die Größenordnung von salpetriger Säure erreicht, müssen in der Zelle gegenüber den Modellversuchen in vitro noch zusätzliche Reaktionen angenommen werden.

5.2. Die Methylierung der DNS in vivo und in vitro

5.2.1. Untersuchung der Methylierung der DNS in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert

Betrachtet man die Methylierung der DNS durch NNMG in vitro in Abhängigkeit vom p_H-Wert (Abb. 14 a und b), so scheint die Methylierungsreaktion zur Deutung des Mutationsoptimums bei p_H 6 wenig beizutragen. Sie wächst mit zunehmender Hydroxylionenkonzentration an und erreicht höchste Werte in einem Bereich, in dem die Mutationsrate bereits wieder sinkt. Ferner ist, wie bereits bei einem Vergleich festgestellt wurde (3.5.), die Methylierung der Nucleinsäuren in vitro viel geringer als in vivo. Daher wurde zunächst einmal die Methylierung der DNS bei den p_H-Werten 5, 6 und 7 in vivo untersucht. Dazu sind E. coli-

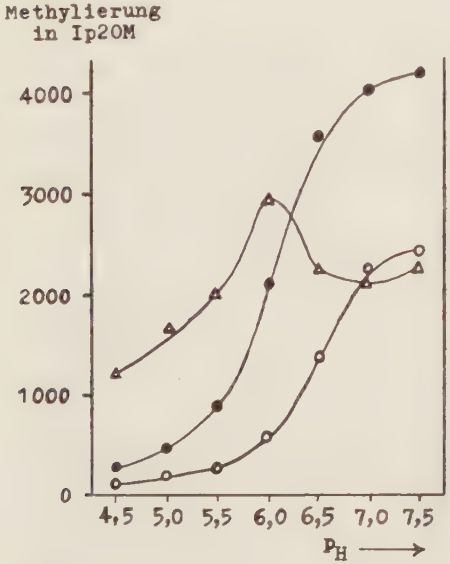


Abb. 14:
Die Methylierung der DNS
a) o—o—o nach 5stündiger Reaktion (300 γ NNMG/0,7 ml, 0,5 mg DNS)
b) ●—●—● nach 12stündiger Reaktion (500 γ NNMG/1,25 ml, 1,0 mg DNS)
c) Δ—Δ—Δ Bedingungen wie a), jedoch unter Zusatz von 3,3 µMol Cystein

Bakterien mit ^{14}C-Methyl-NNMG in Puffer (L 2) fünf Stunden bei 37° inkubiert worden. Drei DNS-Fraktionen des Bakterienextraktes eines Cäsiumchlorid-Dichtegradienten wurden durch Dialyse

gereinigt und ihr Markierungsgrad geprüft. Wie Abb. 15, I veranschaulicht, erfolgt in vivo bereits bei p_H 5 eine Methylierung der DNS in stärkerem Umfange. Sie ist bei p_H 5 ca. 20% und bei p_H 7 ca. 7% geringer als bei p_H 6.

Vergleicht man die Methylierungsrate der DNS mit der Mutationsrate in Tab. 21, so entsprechen sich beide bei p_H 6 und 7. Die verhältnismäßig geringe Methylierung bei p_H 5 könnte für weitere Reaktionen von NNMG mit Nucleinsäuren sprechen, z.B. für eine Desaminierung.

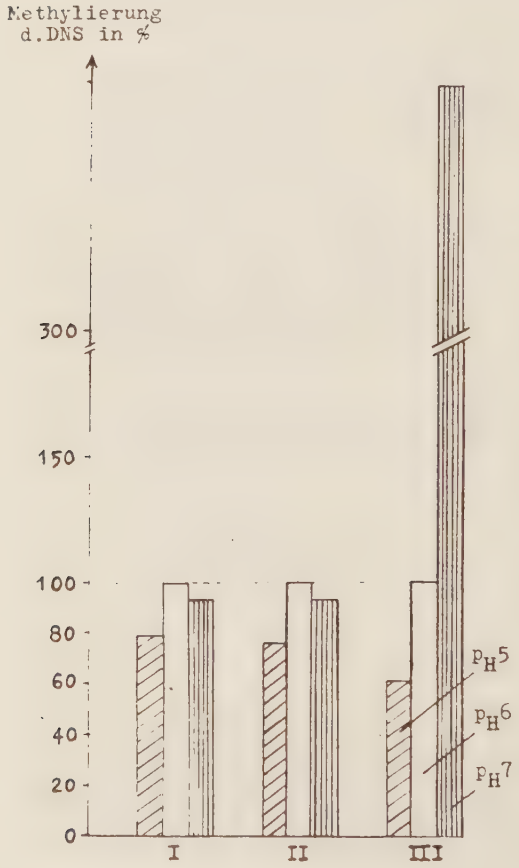


Abb. 15:
Vergleich der relativen Methylierungsraten der DNS bei drei verschiedenen p_H-Werten, bezogen auf das Mutationsoptimum bei p_H 6 gleich 100%, nach 5stündiger Inkubation mit ^{14}C-Methyl-NNMG

I in vivo (20 γ NNMG/ml)

II in vitro (70 γ NNMG/ 0,7 ml) mit 3,3 µMol Cystein

III in vitro wie II, jedoch ohne Cystein

5.2.2. Das Mutantenspektrum in Abhängigkeit vom p_H-Wert

Von Interesse war die Prüfung der Frage, ob etwa die Mutantenspektren der drei p_H-Werte Unterschiede aufweisen. Nach Beckmann und Kaplan (116) ist bekannt, daß die Art des Mutagens die Häufigkeit der Mutationstypen beeinflußt. Demnach sollten Mutagene mit verschiedenem Wirkungsmechanismus verschiedene Mutantenspektren ergeben. Soweit sich Aussagen der Versuche an Phagen mit Bakterienversuchen vergleichen lassen, konnten kaum wesentliche Unterschiede in den Mutantentypen bei den einzelnen p_H-Werten festgestellt werden, die Anhaltspunkte gegen einen einheitlichen Reaktionsmechanismus böten (Exper. Teil 5.2.). Auffallend ist, daß bei der Mutationsauslösung bei p_H 7 häufig Mutanten mit mehrfachem variablem Nährstoffbedarf auftreten (bis 14fach gegenüber maximal 7fach bei p_H 5 bzw. 6). Bei p_H 6 zeigen sich in wenigen Fällen Be-

Tab. 21: Methylierung der DNS in vivo und Mutationsrate bei drei p_H-Werten, bezogen auf 100% bei p_H 6

p_H	Methylierung der DNS in %	Mutationsrate in %
5	56	71
6	100	100
7	87	87

sonderheiten gegenüber p_H 5 und 7, z.B. wenig Methionin-auxotrophe und viele Guanin-auxotrophe Mutanten. Auch konnte bei diesem p_H-Wert eine polyauxotrophe Mutante mit 5fachem Nährstoffbedarf gegenüber maximal 3fachem bei anderen p_H-Werten gefunden werden. Der große Typenreichtum, nahezu alle zu erwartenden auxotrophen Mutanten sind vertreten, empfiehlt NNMG als Mittel der Wahl zur raschen Gewinnung auch seltener Mutanten. Außerdem ist ein Penicillinanreicherungsverfahren entbehrlich, das die Mutantenspektren verfälschen kann (117).

5.2.3. Aktivierung und Optimum der Methylierung in Gegenwart von Cystein

Der Verlauf der Methylierung in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert (Abb. 15, I) und die stärkere Methylierung in der Zelle (vgl. 3.5.) lassen sich nicht mit einer einfachen Reaktion des NNMG mit der DNS erklären.

Eine nichtenzymatische Aktivierung der Methylierung ist jedoch mit Hilfe von Sulfhydrylverbindungen möglich. In Anwesenheit von Cystein wird bei 37° der Methylierungseffekt des NNMG so erhöht, daß nach 5stündiger Einwirkung des Mutagens bereits bei p_H 4,5 noch eine merkliche Methylierung der DNS eintritt, im Gegensatz zum Cystein-freien Ansatz (Abb. 14c). Besonders hervorzuheben ist das Auftreten eines Methylierungsoptimums bei p_H 6 mit einer ca. 5fachen Methylierungsrate im Vergleich zum Cystein-freien Kontrollversuch.

Zum Vergleich mit den Verhältnissen in vivo wurden Versuche auch mit ^{14}C-Methyl-NNMG in vitro bei p_H 5, 6 und 7 wiederholt. Wie die Abb. 15, III zeigt, ist der Anstieg der Methylierung mit steigender Hydroxylionen-Konzentration im Cystein-freien Ansatz beträchtlich. Ein Cystein-Zusatz bestätigt das Methylierungsoptimum bei p_H 6 (Abb. 15, II). Vergleicht man in der Abb. 15 die Methylierung der DNS in vivo und in vitro bei den drei p_H-Werten, so zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Versuchen in vivo (I) und unter Cystein-Zusatz in vitro (II), während der andersartige Verlauf der p_H-Abhängigkeit des Cystein-freien Versuchs (III) den Verhältnissen in der Zelle offensichtlich nicht entspricht.

Schon länger wurden Sulfhydrylverbindungen im Zusammenhang mit der Cancerogenese diskutiert. Die Schutzwirkung von Cysteamin und Cystein gegen letale Dosen von Stickstoff-Lost ist bekannt (118). Emmelot und Mizrahi (119) stellten einen Schutzeffekt des Cysteins gegen Dimethylnitrosamin fest. Es

fanden sich interessanterweise in Tumoren, die gegen alkylierende Stoffe spontan resistent waren, keine größeren Konzentrationen an SH-Verbindungen (120). Schoental untersuchte die Reaktion des Cysteins mit dem Cancerogen N-Nitroso-N-methyl-urethan (NMU), das Tumoren in Lungen, im Magen und im Oesophagus erzeugt (121, 122). Unter neutralen Bedingungen erhielt die Autorin unter Stickstoffentwicklung Cysteinderivate, darunter Methylester und S-Methylverbindungen (s. 5.4.2.). Sie konnte außerdem nach einem Umsatz von Nucleinsäuren mit ^{14}C-Methyl-NMU in Gegenwart von Cystein eine Verdoppelung der Methylierungsrate bei p_H 7,2 nachweisen (122).

5.3. Nähere Untersuchung der Aktivierung der Methylierung

Zur näheren Untersuchung der Aktivierung der Methylierung diente die Transfer-RNS. Eine Prüfung der Abhängigkeit von der Cystein-Konzentration ergab nach zweistündiger Reaktion mit ^{3}H-Methyl-NNMG bei 37°, daß sich der Einfluß der Sulfhydrylgruppe noch bei 20% der molaren Cystein-Konzentration, bezogen auf den NNMG-Zusatz, bemerkbar macht (Tab. 22). Dabei sind

Tab. 22: Methylierung der tRNS nach zweistündiger Inkubation bei p_H 6 durch 2 µMol ^{3}H-Methyl-NNMG in Gegenwart von Cystein

Cystein-Konz. in µMol	Methylierung der tRNS in Ip20M/0,5 mg tRNS
10,0	4370
6,6	4827
5,0	4390
3,3	3291
1,7	2394
0,4	497
0,08	374
ohne Cystein	375

Verluste der reaktiven SH-Gruppe durch Nebenreaktionen, wie Methylierung und Oxydationen, zu berücksichtigen. Diese führen offenbar erst zu einem Methylierungsoptimum bei einem Cystein-Überschuß.

Ein Ersatz des Cysteins durch Methionin läßt nach Tab. 23 nur einen geringen Effekt erkennen. Die Thioäthergruppierung übt demnach keinen wesentlichen Einfluß auf die Methylierungsstärke aus. Eine Untersuchung anderer Schwefelverbindungen

Tab. 23: Einfluß des Methionins auf die Methylierung der tRNS nach zweistündiger Inkubation bei p_H 6 durch 2 µMol ^{3}H-Methyl-NNMG

Methionin-Konz. in µMol	Methylierung der tRNS in Ip20M/0,5 mg tRNS
10,0	702
3,3	749
2,0	513
0,4	338
0,016	385
ohne Methionin	375

der Zelle, wie Biotin und Thiamin-hydrochlorid, erbrachte keine merklichen Methylierungseffekte. Die größte Bedeutung für die Aktivierung der Methylierung kommt demnach den SH-Verbindungen zu, wie auch Versuche mit ß-Mercaptoäthanol bestätigen.

Die Tabelle 24 zeigt, daß die Methylierung der Nucleinsäuren durch SH-Gruppen derart beschleunigt wird, daß sie bei ß-Mercaptoäthanol schon nach ca. 30 Minuten und bei Cystein nach zwei Stunden)$^+$ fast beendet ist. Die Methylierung erreicht nach einer Stunde in Gegenwart von Cystein oder Mercaptoäthanol den rund 20fachen Betrag der Methylierung des zusatzfreien Kontrollversuchs. Nun wird auch verständlich, warum es möglich ist, eine Wachstumshemmung von E. coli durch NNMG mit einem Zusatz von SH-Verbindungen aufzuheben (25, 123). In kurzer Zeit kann das NNMG im Medium zerstört werden, bevor es den Wirkort erreicht hat.

)$^+$ graphisch ermittelt

In der Zelle kommen Sulfhydrylgruppen neben freiem Cystein u.a. im Glutathion, Homocystein, in der reduzierten Form der α-Liponsäure, im Coenzym A und in zahlreichen Enzymen, wie

Tab. 24: Kinetik der Methylierung der tRNS mit 2 µMol ^{3}H-Methyl-NNMG bei p_H 6 mit und ohne Zusatz von 3,3 µMol Cystein bzw. ß-Mercaptoäthanol

	Methylierung der tRNS in Ip20M/0,5 mg tRNS		
Zeit in Std.	ohne Zusatz	mit Mercaptoäthanol	mit Cystein
0,25	-	3343	2465
0,50	-	3521	3284
1	187	3593	3466
2	-	3509	-
4	833	-	3856
8	1343	3511	3658
12	-	3312	3691
24	3631	-	-

Transferasen der Proteinbiosynthese und Dehydrasen, vor. Ein Aktivitätsverlust durch eine Oxydation kann in der Zelle durch reduzierende SH-Verbindungen wieder rückgängig gemacht werden (124).

Die Hypothese einer Aktivierung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in der Zelle überwindet nach den dargelegten Ergebnissen die großen Unterschiede zwischen der Methylierung der Nucleinsäuren durch NNMG in vivo und in vitro und macht sie als Modellreaktion für die Mutationsauslösung plausibel.

5.4 Die Methylierung in der Zelle und in vitro

5.4.1. Natürliche Methylderivate der Nucleobasen und über ihre enzymatische Entstehung

In den natürlichen Nucleinsäuren kommen zahlreiche Methylderivate der Basen vor. Die meisten Methylierungsprodukte

weisen die Transfer-Ribonucleinsäuren auf, wie 1-Methyladenin, N^6-Methyladenin, N^6-Dimethyladenin, 1-Methylguanin, N^2-Methylguanin, N^2-Dimethylguanin, 5-Methylcytosin und 1-Methylhypoxanthin. 7-Methylguanin wurde in der tRNS aus Schweineleber, Blättern von Brassica chinensis und Hefe gefunden (125). In den Ribonucleinsäuren ist auch die Ribose in der 2'-Stellung methyliert. Die Methylierung der tRNS erfolgt enzymatisch auf der Stufe der Nucleinsäure, wie sie für Uracil im Pentanucleotid von Sarkar und Comb (126) nachgewiesen werden konnte: GUUCG $\longrightarrow$ $\longrightarrow$ GrTΨCG (rT = Ribothymidylsäure). Auch die DNS besitzt methylierte Basen. 5-Methylcytosin wurde in Pflanzen- und Tier-DNS (127) und N^6-Methyladenin in Bakterien-DNS gefunden (128).

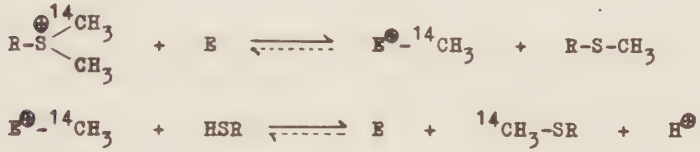
Die Transmethylasen sind für die DNS und RNS spezifisch und beziehen die Methylgruppen aus verschiedenen Quellen (129). Die Methylgruppen der methylierten Purine der tRNS (130, 131), wie 2-Methyladenin und N^6-Methyladenin, und des Ribothymidins (130) stammen aus dem S-Adenosylmethionin. Wie schon erwähnt, liefert dagegen die N^5, N^{10}-Methylentetrahydrofolsäure die Methylgruppe für die Bildung des Desoxyribothymidins (108, 109).

Methylderivate, von denen eine mutagene Wirkung zu erwarten wäre, wie 7-Methylguanin, 1- und 3-Methyladenin sowie 1-Methylcytosin, sind in der tRNS selten und in der DNS nicht gefunden worden. Magee et al. (100, 132) entdeckten in der Ratten-RNS 7-Methylguanin erst nach Behandlung mit Dimethylnitrosamin oder n-Butyl-methyl-nitrosamin.

Adenosylmethionin ist ein Beispiel für die Beteiligung schwefelhaltiger Verbindungen an Methylierungen. Nach Bremer et al. (133) wird die ^{14}C-Methylgruppe des S-Adenosylmethionins auf SH-Gruppen übertragen. Eine Transmethylase überträgt sie mit einem Aktivitätsoptimum bei p_H 7,5 - 8,0 auf Homocystein, wie Shapiro et al. (134) mit zellfreien Extrakten von S. cerevisiae nachgewiesen haben:

$$\text{Homocystein} + \text{S-Adenosylmethionin} \longrightarrow \text{Methionin} + \text{S-Adenosyl-homocystein} + H^+$$

Die Spezifität der Transmethylasen ist gering, da selbst Methylgruppen des S-Adenosylmethionins auf die Hydroxylgruppe des Wassers übertragen werden können (135). Angesichts der großen Unterschiede der Akzeptoren ist es schwierig, einen einheitlichen Mechanismus der enzymatischen Transmethylierung aufzustellen (135). Durell und Cantoni (136) geben für die Thetin-Homocystein-Transmethylierung folgende hypothetische Reaktion an:



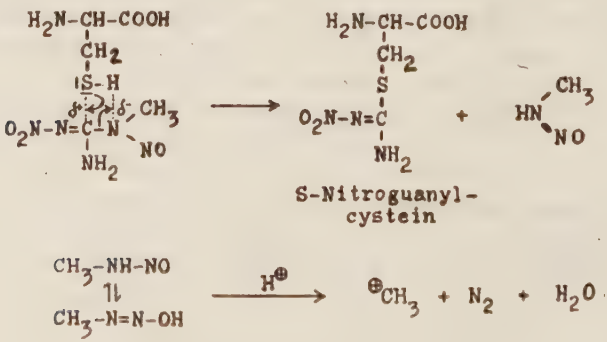
Eine Markierung der Methylgruppe (s. Gleichungen) führte jedoch zu keinem Hinweis darauf, daß methylierte Enzyme als Intermediärprodukte fungieren (136).

5.4.2. Hypothesen für einen Reaktionsmechanismus der Methylierung durch NNMG in Gegenwart von Sulfhydrylverbindungen

Die größte Ähnlichkeit mit einer enzymatischen Transmethylierung durch Schwefelverbindungen hat die Reaktion nach Challenger (137). Unter wasserfreien Bedingungen transferiert Dimethylsulfonio-essigsäure-betain (Dimethylacetothetin) bei höherer Temperatur eine Methylgruppe auf aromatische Amine, z.B. Anilin:

Die Autoren nehmen an, daß die positive Ladung der Sulfoniumgruppe ($(CH_3)_2\overset{+}{S}$-) die Methylgruppe schwach positiviert, so daß der nucleophile Angriff durch das einsame Elektronenpaar der Aminogruppe möglich ist. Bei der Umsetzung von NNMG mit Cystein konnte bei p_H 6 und 37° auch S-Methylcystein erhalten werden. Weil jedoch die Reaktionsbedingungen unphysiologisch sind und bei Methionin nur ein geringer Methylierungseffekt zu beobachten ist, kommt dieser Reaktion über ein Methylsulfoniumderivat wohl kaum Bedeutung zu. Auch läßt sich die Bindung zwischen dem S-Atom und der Methylgruppe im S-Adenosylmethionin nicht hydrolytisch spalten (135). Dies steht im Gegensatz zu der leichten enzymatischen Lösung der Bindung.

Hinweise auf den Mechanismus der Methylierung von NNMG in Gegenwart von Cystein geben Versuche von Schoental et al. (121, 138, 139). Sie stellte mit N-Nitroso-N-methyl-urethan in Gegenwart von Zellgewebe eine Gasentwicklung fest und konnte dann aus der Umsetzung von NMU mit Cystein mehrere Cysteinderivate erhalten: u.a. S-Methylcystein, S-Äthoxycarbonylcystein, Cystin und Cysteinsäurederivate. In einer Reaktion von NNMG mit Cystein bei p_H 6 konnten in eigenen Versuchen unter Stickstoffentwicklung ebenfalls zahlreiche Produkte festgestellt werden. Von diesen sind S-Methylcystein, Cystin, Cysteinsäure und eine Ninhydrin-negative Substanz nachgewiesen wor-



den, bei der es sich vermutlich um ein Nitroguanylierungsprodukt handelt. Auch hier kommt wie bei NMU neben einer Oxydationswirkung ein nucleophiler Angriff der SH-Gruppe am NNMG-Molekül in Frage. Unter Freisetzung des methylierenden Agens übernimmt die Sulfhydrylverbindung die Nitroguanylgruppe, die als Bestandteil eines Enzyms zu seiner Inaktivierung führen könnte.

5.4.3. Die Methylierung in der Zelle

Neben einer Metabolisierung der markierten Methylgruppen können S-Methylderivate und Methylester sowie Methylierungen am Pyrrolring des Tryptophans und am Imidazol des Histdins die Markierung des Proteins erklären. Die Untersuchung des Verbleibens der ^{14}C-markierten Methylgruppe des NNMG im Protein könnte dies bestätigen und bei wesentlich längerer Einwirkung des NNMG im Komplettmedium den Metabolismus des Mutagens klären helfen.

Die DNS-Synthese wird durch NNMG noch nach zwei Stunden im Komplettmedium fast völlig gehemmt (s. 4.1.). In der gleichen Zeit hat bei Einwirkung von ^{3}H-Methyl-NNMG eine beträchtliche Markierung der Nucleinsäure sowohl bei Inkubation im Komplettmedium als auch in Pufferlösung stattgefunden (s. 3.5.). Dies spräche gegen eine enzymatische Transmethylierung. Ryan und Borek (129, 140) beobachteten jedoch, daß in Bakterienzellen, die sie mit UV in DNS-Synthese hemmenden Dosen bestrahlten, Methylierungsreaktionen in beträchtlichem Maße fortgesetzt wurden. Die Autoren halten es für möglich, daß Enzyme neue Stellen der Nucleinsäuren methylieren, was mit der Unspezifität der Transmethylasen in Einklang stünde (s.5.4.1.). Druckrey et al. (34) nehmen auf Grund ihrer Beobachtungen bei der Carcinom-Entstehung durch die nicht alkylierenden Dialkylnitrosamine und die reaktiven Methylnitrosamide einen nichtenzymatischen Mechanismus für NNMG an. Die mutagene und cancerogene Wirkung der Dialkylnitrosamine setzt Enzyme voraus, die oxydativ diese Moleküle abbauen und das methylierende Agens freisetzen. Ein solcher Abbau ist bei dem reaktiven NNMG nicht erforderlich.

Legt man einer Schätzung des Prozentsatzes methylierter Guanylsäure die spezifische Radioaktivität von $1{,}0 \cdot 10^2$ 1pM/mg DNS (s. 3.5.) unter Vernachlässigung einer Metabolisierung der markierten Methylgruppe zugrunde, so tragen 0,037% der Nucleotide eine Methylgruppe. Entfallen ca. 70% der Methylierung aller Basen auf Guanin (vgl. 3.2.), so sind 0,026% des Guanins methyliert. Die gleiche Größenordnung wurde mit 0,06% nach Behandlung der Ratten mit Dimethylnitrosamin aus Rattennieren-DNS und mit 0,05% 7-Methylguanin von Swann nach intravenöser Injektion von Methansulfonsäuremethylester aus Rattenhoden-DNS erhalten (141).

Läßt sich die Mitwirkung von Enzymen auch nicht ausschließen, so kommt der Aktivierung durch SH-Verbindungen zumindest die Bedeutung einer Modellreaktion zu, die eine p_H-Abhängigkeit der Methylierung verständlich macht, wie sie offenbar für eine Mutationsauslösung in Frage kommt, für die ein Optimum bei p_H 6 gefunden wurde.

6. Über die Mutationsauslösung durch NNMG

6.1. Ein Vergleich des NNMG mit anderen alkylierenden Mutagenen

Die Methylierung der Nucleinsäuren als hauptsachliche mutagene Reaktion des NNMG läßt sich noch durch Vergleich mit anderen alkylierenden Mutagenen stützen.

Eisenstark et al. (32) stellten fest, daß durch NNMG induzierte Vorwärtsmutanten von dem alkylierenden Diäthylsulfat in gleicher Anzahl revertiert werden. Gleiche Loci werden mit wenigen Ausnahmen sowohl durch Diäthylsulfat als auch durch NNMG revertiert. Daraus schließt der Autor auf einen gleichen Spezifitätsbereich beider Mutagene.

Nach Versuchen der Arbeitsgruppe Tessman (142) mit 1-Strang-DNS der Phagen S 13 und ΦX 174 zeichnet sich Methansulfonsäureäthylester (MSÄ) durch eine besondere Häufigkeit der Transitionen

$$\begin{matrix} G \\ C \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} A \\ T \end{matrix} \qquad \begin{matrix} A \\ T \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$$

aus, wie Untersuchungen mit Vorwärts- und Reversionsmutanten ergaben. Studien von Krieg mit MSÄ-induzierten Reversionen bei Phagenmutanten T 4rII bestätigen diese Ergebnisse (143).

$\frac{G}{C}$ wurde aber auch für NNMG als Hauptmutationsort von v. Malling und DeSerres erkannt (45). Der nach Ergebnissen der Proteinbiosynthese (s. 2.1.3.) und der Methylierung in vitro (s. 3.2.) gefundene Hauptangriffsort des Mutagens NNMG Guanin/Cytosin stimmt damit überein.

Nach Erfahrungen von Marquardt und Mitarbeitern mit 7 alkylierenden Verbindungen wirkt am Mutationsort ad_{6-45} von S. cerevisiae stets die Methylgruppe stärker mutagen als die Äthylgruppe (51). Damit kann die hohe mutagene Wirksamkeit des NNMG im Vergleich zu äthylierenden Mutagenen, wie MSÄ, verständlich werden.

Zwar kommt Tessman angesichts einer schwachen mutagenen Wirkung der salpetrigen Säure auch auf Thymin und des Hydroxylamins auf Thymin, Adenin und Guanin zu der Überzeugung, daß "die chemische Reaktionsrate ein unzuverlässiger Führer für die Voraussage der relativen Mutationsrate" sei. Nichtsdestoweniger stimmen aber die besonders häufigen Basenübergänge mit der chemischen Reaktionsweise so weit überein, daß Analogieschlüsse auf die Vorgänge in der Zelle wohl berechtigt erscheinen.

6.2. Über die Funktion der Methylgruppen in den Nucleinsäuren

Über die Funktion der natürlichen Methylierung in der Zelle ist wenig bekannt. Zum Verständnis der anomalen Methylierung der DNS wurde eine Schutzfunktion gegen homologe DNS spaltende Enzyme erwogen (129). Bei der tRNS ist eine Häufung solcher methylierten Basen, die sonst selten vorkommen, in den Schleifen festzustellen. Vielleicht dient sie zur Unterscheidung von der mRNS, die keine methylierten Basen enthält. Dadurch könnte die Möglichkeit unterbunden werden, als Matrize zu dienen.

Eine Methylierung in 5-Stellung des Uracils in der Polyuridylsäure läßt den sog. Schmelzpunkt oder Phasenübergang um $27{,}5^{\circ}$ ansteigen, woraus eine Erhöhung der Strukturordnung folgt (129, 144). Diese Polyribothymidylsäure verstärkt gegenüber Polyuridylsäure die Bindung an die Polyadenylsäure über Wasserstoffbrücken (144). Die Einführung der Methylgruppen kann demnach die Stärke der Wasserstoffbrücken-Bindung oder die Konformation ändern. Demgegenüber berichten Michelson und Pochon (145) von einer Stabilitätssenkung des Komplexes der Poly-7-Methylguanylsäure mit der komplementären Polycytidylsäure. Er wird auch nur im Mengenverhältnis 1 : 1 gebildet. Eine Methylierung des Adenins in 1-Stellung verhindert die Reaktion mit der Polyuridylsäure (145). Gleichfalls nur im Mengenverhältnis 1 : 1 wird ein Komplex aus Poly-N^6-Methyladenylsäure und Polyuridylsäure gebildet, der sich ebenfalls als instabil erweist. Michelson und Grunberg-Manago (146) stellten mit Hilfe der Proteinbiosynthese Amino-

säureeinbauhemmungen mit alkylierten Polyadenylsäuren fest, die 1-Methyl- bzw. N^6-Methyladenin enthielten. Die Funktion der Methylierung des Uracils in 5-Stellung wird aus der Stabilitätserhöhung der Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem komplementären Adenin in der DNS verständlich. Sie wurde vermutlich wegen der exakteren Informationsweitergabe selektioniert. Eine Methylierung in 1- oder N^6-Stellung des Adenins sowie in 7-Stellung des Guanins führt dagegen nach den Autoren auf Grund der Unmöglichkeit oder geringeren Stabilität der Basenbildung zwangsläufig zu einer Behinderung der Informationsweitergabe. Dadurch kann eine Mutationsauslösung verursacht werden.

6.3. Mechanismen der Mutationsauslösung für alkylierende Mutagene

Abb. 16 gibt die Angriffspunkte der Methylierung der DNS durch NNMG an. Als Folge einer Alkylierung der Nucleobasen in der

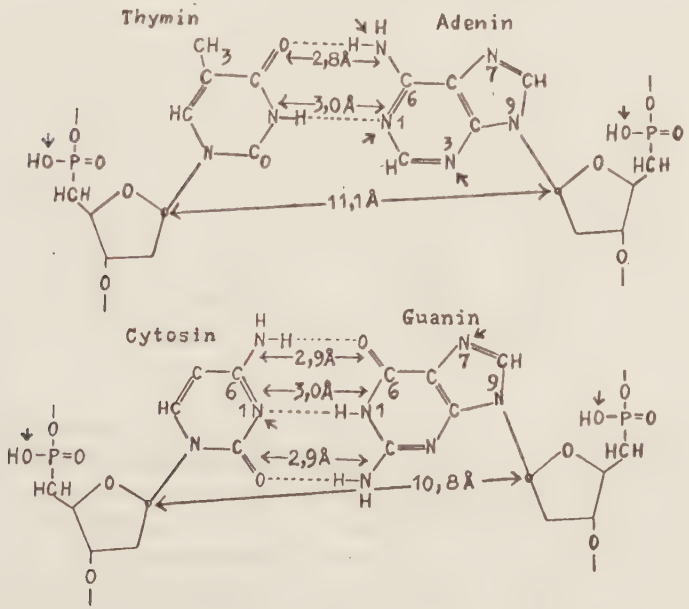


Abb. 16: Die Basenpaarung in der DNS-Doppelhelix (nach verschiedenen Autoren), ↗ mögliche Angriffspunkte der Methylierung durch NNMG

DNS ergeben sich für den Mechanismus der Mutationsauslösung verschiedene Möglichkeiten.

6.3.1. Die Code-Änderung als direkte Folge einer Alkylierung der Basen durch das Mutagen

Brookes und Lawley (147) erwägen als direkte Folge der Alkylierung des Guanins in 7-Stellung eine anomale Basenpaarung. Die Alkylierung soll die Acidität in 1-Stellung so anwachsen lassen, daß die ionisierte Form bei neutralem p_H-Wert mengenmäßig überwiegt und eine Basenpaarung mit Thymin möglich wird. In der Replikation würde dann 7-Methylguanin durch Adenin ersetzt (Abb. 17). Nagata et al. konnten auf wellenmechanischer Grund-

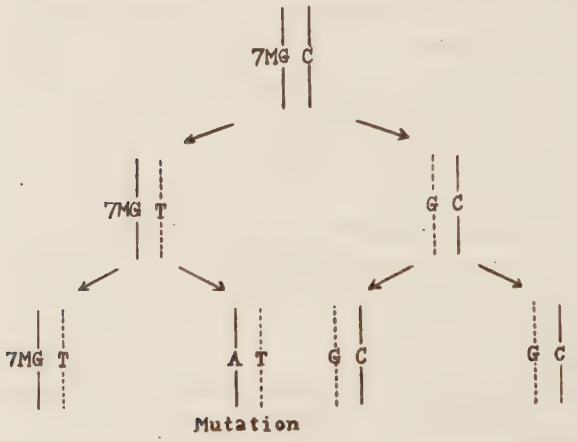


Abb. 17: Hypothese von Brookes und Lawley: Transition G → A, C → T

lage einen Mechanismus angeben, der die gleiche Transition zur Folge hat (zit. n. 147). Nach Wilhelm und Ludlum (93) verhält sich aber 7-Methylguanin nicht wie Adenin. Mit alkyliertem Poly-UG konnten sie keine Code-Änderung in diesem Sinne mit Hilfe der zellfreien Proteinbiosynthese beobachten. Mit dem Anwachsen des Anteils an 7-Methylguanin steigt die Einbauhemmung in der Reihe Phenylalanin (UUX,X=U,C,A,G), Valin (GUX, X=U,C,A,G) und Glycin (GGX, X=U,C,A,G). 7-Methylguanin inaktiviert offenbar das Code-Triplett. Dies erklärt auch die Synthesehemmung

bei NNMG-behandeltem Poly-AG in der Reihe Lysin ($AA\frac{A}{G}$), Glutaminsäure ($GA\frac{A}{G}$) und Arginin (CGX; X=U,C,A,G; $AG\frac{A}{G}$) (vgl. 2.1.1. !), die auf eine Methylierung des Guanins zurückgeführt wurde. Es ist jedoch hierbei zu berücksichtigen, daß diese Modellversuche in vitro nur bedingt auf die Verhältnisse in der lebenden Zelle bezogen werden dürfen. Sie sind nur auf die Mutationsauslösung bei Viren übertragbar, die in vitro vorgenommen wird. Mit ihr konnte daher auch eine Übereinstimmung festgestellt werden (s. 2.1.).

Bei Adenin ist nach Brookes und Lawley (147) die zweite für eine Methylierung günstige reaktive Stelle der DNS die 3-Stellung. Etwas ungünstiger ist die 1-Stellung des Adenins. In der RNS ist die 1-Position frei verfügbar. In geringem Maße findet man in 3-Stellung methyliertes Adenin. Beide Methylderivate konnten in eigenen Versuchen mit NNMG erhalten werden (s. 3.3.2.). Die Begünstigung einer anomalen Basenpaarung als Folge der Änderung der Wasserstoffbrücken-Bindungsverhältnisse auf Grund einer Alkylierung fand keine allgemeine Zustimmung (147). Die Reaktion der Polyadenylsäure mit NNMG hatte neben einer Hemmung zu einer Code-Änderung geführt. Sie ließ sich in Übereinstimmung mit der Hypoxanthin-Bildung bei chemischen Experimenten auf eine Desaminierung zurückführen (s. 3.1.2.). Die Polylysinsynthese-Hemmung (s. 2.1.3.) kann mit der Alkylierung in 1-Stellung gedeutet werden, die eine Basenpaarung nach Michelson und Pochon (145) sowie nach Michelson und Grunberg-Manago (146) verhindert. Nach diesen Autoren wirkt das in Spuren gefundene N^6-Methyladenin im gleichen Sinne. Dies folgt auch aus Abb. 16.

Brookes und Lawley wiesen nach Alkylierung mit Methansulfonsäuremethylester in der RNS und auch in der DNS 1-Methylcytosin nach. In undenaturierter DNS ist die 1-Stellung durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung blockiert (97). In eigenen Versuchen wurde 1-Methylcytosin aus der Polycytidylsäure nach Behandlung mit NNMG nachgewiesen (s. 3.3.3.). Das Methylderivat sollte die Wasserstoffbrücken-Bindung an dieser Stelle verändern, doch gaben nach Brookes und Lawley bisherige Versuche keine Kla-

ren Ergebnisse. Die Hemmung der Polyprolinsynthese bei NNMG-behandelter Polycytidylsäure kann jedoch mit der nachgewiesenen Alkylierung des Cytosins gedeutet werden (s. 3.3.3.), da sehr wahrscheinlich 1-Methylcytosin die Basenpaarung behindert. Brookes und Lawley entdeckten in der RNS, daß in neutraler und alkalischer Lösung 1-Methylcytosin in geringem Maße zu 1-Methyluracil desaminiert wird (97).

An einer mit NNMG behandelten Polyuridylsäure war eine Hemmung der Proteinbiosynthese zu beobachten (s. 2.1.3.). Außerdem folgte eine Code-Änderung aus dem Leucineinbau. Abell et al. (77) fanden den gleichen Effekt mit Senfgas und erklärten ihn mit einer Paarungsanomalie. Sie stellten nur eine Alkylierung der Phosphatgruppe der Uridylsäure fest. Es gelang ihnen ebensowenig wie Brookes und Lawley (97), eine Methylierung des Uracils in der DNS nachzuweisen. Erst bei p_H 9 konnten Scannell und Mitarbeiter bei Raumtemperatur mit Dimethylsulfat 1- und 3-Methyl- und 1,3-Dimethylderivate des Uracils und Thymins erhalten (148, 25).

6.3.2. Code-Änderung auf Grund eines Basenverlustes als Folge einer Alkylierung

Nucleinsäuren können bestimmte alkylierte Basen infolge einer Elektronenverschiebung durch eine hydrolytische Spaltung der N-Glycosidbindung leicht verlieren. Bei methylierter DNS wurde von Lawley und Brookes (97) bei 37° unter neutralen Bedingungen ein stärkerer Verlust an 3-Methyladenin und ein schwächerer an 7-Methylguanin gefunden. Bleibt das Zucker-phosphat-Rückgrat erhalten, kann die entstandene Lücke durch eine der vier Basen von Reparaturenzymen ausgefüllt werden. Dies hätte Transitionen und Transversionen zur Folge. Die Mitwirkung des intakten komplementären DNS-Stranges als Matrize verringert das Auftreten eines Fehlers. Das Zusammentreffen von Lücken auf den gegenüberliegenden Strängen bietet die größte Aussicht für das Auftreten einer Code-Änderung. Die

Hemmung der Proteinbiosynthese nach Behandlung des Poly-AG mit NNMG kann auch auf Lücken in der RNS-Kette beruhen, die durch Abspaltung des 7-Methylguanins entstanden sind. Da

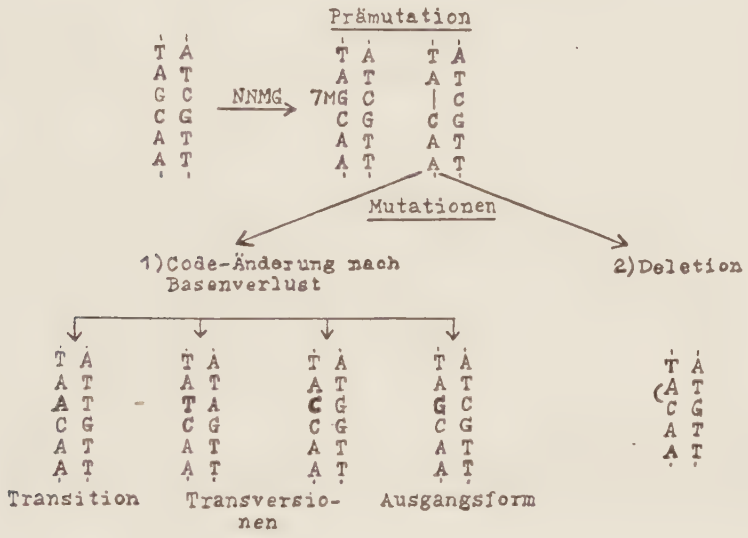


Abb. 18: Code-Änderung durch Basenverlust und Deletion. Schema nach verschiedenen Autoren, verändert.

lückenfüllende Reparaturenzyme im Proteinsynthesesystem praktisch fehlen, können so entstandene Code-Änderungen nicht erfaßt werden. Dies gilt auch für die Hemmungseffekte NNMG-behandelter Polyadenyl- und Polycytidylsäure. Lawley und Brookes (97) beobachteten, daß im neutralen p_H-Bereich 3-Methyladenin sechsmal schneller von methylierter DNS abgespalten wird als 7-Methylguanin.

Für das 1-Methylderivat des Desoxycytidins wurde in neutraler Lösung im Gegensatz zu saurer (97) ebenfalls eine Labilität festgestellt.

Es ist auch möglich, daß die zur Basenpaarung durch eine Methylierung unbrauchbar gewordenen Basen durch Glycosidbindungspaltende Desoxynucleasen aus der DNS entfernt werden. Gegenüber einer Code-Änderung als direkte Folge einer Alkylierung scheint diesem Mechanismus der Vorrang zuzukommen. Brookes und Lawley weisen ihm bei der Mutagenese eine wesentliche Rolle zu.

Eine Stütze erhält diese Hypothese durch vergleichende Untersuchungen der Mutationsspektren, die mit Hilfe extrazellulärer Behandlung der χ-Phagen vorgenommen wurden (116). Die mutagene Wirkung der Säuren ist bekannt (149). Sie beruht auf einem Verlust der Purinbasen bei intaktem DNS-Rückgrat. Es entsteht hierbei "Apurinsäure". Da Mutationsspektren von Methansulfonsäureäthylester und Säuren eine ähnliche Verteilung der Mutantentypen aufweisen (116), kann angenommen werden, daß der gleiche Mutationsmechanismus zugrunde liegt. Er besteht in der Basenabspaltung. Die Wirkung der Säuren läßt sich also durch eine Methylierung der Basen ersetzen. Parallelen in der Mutationsauslösung zwischen NNMG und anderen alkylierenden Agenzien, wie MSÄ, stehen damit in Einklang.

6.3.3. Andere Mechanismen der Mutationsauslösung

Spalten die Nucleinsäuren ihre methylierten Basen heraus, kann eine Deletion auftreten, wie sie für die mutagene Wirkung des Proflavins am Bakteriophagen T4 zuerst von Brenner et al. (150) angenommen wurde (s. Abb. 18). Für eine Rolle der Purin-Deletionen auch bei alkylierenden Mutagenen spricht der Befund, daß mit Proflavin induzierte Mutanten durch Äthylierung revertiert werden. Mit NNMG gelang es Whitfield et al. lediglich, Revertionen der Basensubstitutionsmutationen des O-Typs, nicht aber der Schubmutationen, zu erhalten (151).

Purin-Deletionen können letal wirken, wenn von der Desoxyribose auch die Phosphatgruppe abgespalten und damit die DNS-Kette zerstört wird (141, 152). Solche Vorgänge lösen einen Repairmechanismus aus, wie er bei UV-bestrahlten Zellen von

E. coli studiert wurde (153). Ein DNS-Schaden, wie er durch eine Pyrimidin-Dimerisierung verursacht werden kann, führt zu einem Herausschneiden der paarungsbehinderten Nucleotide. Die so entstandene Lücke kann noch durch Einzelstrangabbau auf 6 bis 7 Tripletts erweitert werden (154). Dann wird eine Reparatur mit Hilfe des intakten komplementären Polynucleotidstranges vorgenommen und schließlich die Vereinigung der Phosphatdiester-Glieder zur vollständigen DNS-Kette herbeigeführt. Eine Reparatur dieser Art ist bei Viren mit ihren Einzelstrang-Polynucleotiden nicht möglich. Nach Ansicht Holidays (153) können die Einzelstranglücken an den gegenüberliegenden Stellen homologer DNS-Stränge zu einer Entflechtung der Stränge in benachbarten Doppelstrangregionen führen. Die zwei sich bildenden Stränge enthalten Teile des gegenüberliegenden Partners (Abb. 19). Diese Hybrid-DNS-Konfiguration ist vergleichbar mit einem Crossingover.

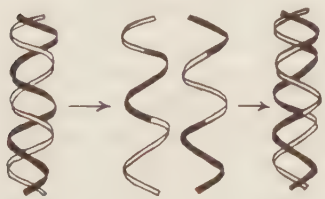


Abb. 19: Bildung einer Hybrid-DNS

Bei dem leichten Zerbrechen des DNS-Stranges nach der Entpurinisierung infolge Alkylierung ist ein solcher Mechanismus auch für die NNMG-Mutagenese wahrscheinlich. Ein enzymatisch bewirktes Herausschneiden von Nucleobasen, die durch Methylierung oder Nitroguanylierung die Basenpaarung hemmen, kann ebenfalls zur Bildung einer Hybrid-DNS führen. Ein Repairmechanismus, der sehr ähnlich funktioniert wie der bei UV-geschädigter DNS, wurde bei NNMG von Cerdá-Olmedo und Hanawalt (155) gefunden. Einen engen Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und NNMG zeigt auch die Kreuzresistenz NNMG-resistenter Mutanten gegen UV-Strahlung (156). Malke erklärt sie mit einer gemeinsamen Fähigkeit resistenter Zellen, DNS-Schäden wirkungsvoller zu beheben (157).

6.4. Einrichtungen der Zelle zum Schutz der Kontinuität der Vererbung

Bei der Einwirkung des Mutagens auf die Zellen wird der größte Teil abgetötet, wobei außer mutagenen Effekten, die Funktionen lebenswichtiger Prozesse betreffen, auch toxische Wirkungen auftreten. Außer der Resistenz verfügt der Organismus über weitere Einrichtungen, die das Erbgut der Zelle schützen.

6.4.1. Die Degeneration des genetischen Codes

Nach Goldberg und Wittes (158) stellt die Degeneration des genetischen Codes einen solchen Schutz auf dem Organisationsniveau dar, den schon Sonneborne als Möglichkeit zur Verringerung der Mutationsereignisse erkannte. Wäre jeder Aminosäure nur ein bestimmtes Codon zugeordnet, müßten 44 von 64 Basenkombinationen Nonsense-Codons sein. Dies würde bedeuten, daß die meisten Ein-Schritt-Mutationen zu einem Peptidkettenabbruch führten. Jedoch schon ein zweifach degenerierter Code, z.B. Phe $UU\frac{U}{C}$ allg. abpu oder abpy), schützt gegen Transitionen. Im vierfach degenerierten Code, z.B. Prolin mit dem Codon (X = U, C, A, G; allg. abx), der etwa die Hälfte aller Aminosäuren betrifft, bleiben 33% aller ausgelösten Transitionen und Transversionen unwirksam, da in ihnen das veränderte Codon dieselbe Aminosäure codiert. Bei dem sechsfach degenerierten Code, z.B. Leucin mit den Codons CUX (X = U, C, A, G) und $UU\frac{A}{G}$, führt eine Transition der ersten Base zu einer zusätzlichen Verringerung der Mutationsereignisse.

6.4.2. Höhere Paarungsspezifität bei Codons mit GC-Zusammensetzung

Mit der Degeneration im Zusammenhang steht nach Goldberg und Wittes (158) ein Schutzmechanismus auf Nucleotidniveau. Der Tabelle der Codons läßt sich folgendes entnehmen: Alle Tripletts, die als erste und zweite Codonbase nur Guanin enthalten, sind vierfach degeneriert (z.B. GCX Alanin), die kein Guanin oder Cytosin enthalten, sind zweifach degeneriert (z.B. UUX

Phenylalanin) und die ein Guanin enthalten, nehmen eine Zwischenstellung ein. Die Ursache für die Beziehung zwischen der GC-Zusammensetzung und der Degeneration ist in der größeren Affinität der GC-Paare zu suchen. Hier ist eine zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung im Gegensatz zur Adenin-Uracil-Bindung möglich (s. Abb. 16). Bekanntlich liegt der Schmelzpunkt genannte Denaturierungspunkt der DNS umso höher, je größer ihr GC-Anteil ist (159). Eine größere Affinität zwischen Guanin und Cytosin beugt einem Lesen der Wobble-Base in der tRNS vor. Dadurch ist eine höhere Degeneration des Codes möglich. Auf diese Weise vermag auch die GC-Zusammensetzung die Degeneration zu determinieren. Tripletts mit hoher GC-Zusammensetzung besitzen eine höhere Paarungsspezifität und sind somit resistenter gegen Mutationen.

6.4.3. Mutationen zu "ähnlichen Aminosäuren"

Hat dennoch ein Basenaustausch stattgefunden, z.B. durch eine Transition oder Transversion der ersten oder zweiten Codonbase, so werden "ähnliche Aminosäuren" codiert. Das Bemühen, eine Beziehung zwischen Codons und Aminosäuren festzustellen, führte Pelc (160) zu der Erkenntnis, daß hydrophile Aminosäureseitenketten, z.B. saure und basische Aminosäuren, von Codons mit A bzw. G als zweiter Triplettbase, Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten bevorzugt von U und C codiert werden. Volkenstein (161) stellte fest, daß polare Aminosäuren von A- und C-haltigen Tripletts, unpolare dagegen hauptsächlich von G und U determiniert werden. Goldberg und Wittes (158) verwandten die Größe der Änderung der freien Energie der Seitenketten der Aminosäuren beim Übergang aus hydrophobem Lösungsmittel in Wasser als Maß für die Häufigkeit, mit der die Aminosäuren durch einen Basenaustausch im Codon durch hydrophobe Aminosäuren ersetzt werden. Alle drei Verfahren ergeben, daß eine Transition oder auch eine Transversion der ersten oder zweiten Base meistens zu einem Ersatz durch ähnliche Aminosäuren führt, die durch ähnliche Seitenketten, gleiche Polarität oder durch einen ähnlich hohen Betrag der Änderung der freien Energie charakterisiert sind. Wie bekannt ist, ändert sich die Proteinfunktion kaum, wenn

eine Aminosäure durch eine andere mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt wird. So ist im Hypophysenhormon Vasotocin (2) das basische Arginin mit dem Codon AG $^{A}_{G}$, das an bestimmter Stelle im Protein fast allen Säugern gemeinsam ist, im Schwein in einer Transition durch das gleichfalls basische Lysin mit dem Codon AA$^{A}_{G}$ ersetzt worden.

Wie sich die Desaminierung des Adenins durch NNMG in der Transition A $\longrightarrow$ G auswirkt, zeigt Tab. 25. Der Austausch der Aminosäuren ist so gestaltet, daß viele Eigenschaften, wie sie in den erwähnten Ähnlichkeitskriterien zum Ausdruck kommen, weitgehend erhalten bleiben. Zu beachten ist ferner die Stabilisierung der Codons ACX und AGX durch die GC-Zusammensetzung.

Der genetische Code ist also so organisiert, daß bei einer Ein-Schritt-Mutation ein Austausch sehr verschiedener Aminosäuren wenig wahrscheinlich ist. Die Feststellung v. Sengbuschs, daß polare Aminosäuren seltener als erwartet ausgetauscht werden, schränkt diese Aussage nicht ein. Er erklärt dies mit einer Selektion auf der Stufe der Proteinstruktur; denn mancher Aminosäurenaustausch hat z.B. eine Verringerung der Proteinfaltung oder der Proteinlöslichkeit zur Folge (163).

Auf Grund der dargelegten Schutzeinrichtungen und Reparaturmechanismen ist der Organismus befähigt, bei einem Angriff chemischer Mutagene eine Mutation zu einem relativ seltenen Ereignis werden zu lassen. Eine Überschlagsrechnung unter bestimmten Voraussetzungen (s. 5.4.3.) zeigt im Falle des NNMG, daß von $2 \cdot 10^7$ geschätzten Nucleotiden eines Chromosoms einer Zelle von E. coli (52) ca. $7 \cdot 10^3$ Nucleotide eine Methylgruppe des NNMG nach zweistündiger NNMG-Behandlung tragen. Berücksichtigt man, daß trotz dieser starken Methylierung nur 10 bis 20% auxotrophe Mutanten festzustellen sind, wird die Leistungsfähigkeit der Schutzeinrichtungen deutlich. Eine Letalität, die lediglich auf einer Code-Änderung beruht, dürfte seltener sein, als angenommen wurde (164). Bei NNMG kommt hinzu, daß es infolge seiner geringen Reaktivität im Gegensatz zu anderen

Tab. 25: Eigenschaftsänderungen durch Aminosäurenaustausch auf Grund der Transition A⟶G

Änderung d. 1. u. 2. Base im Codon	Austausch d. Aminosäuren	Veränderungen d. Eigensch. n. Ähnlichkeitskriterien		
		I. (nach Volkenstein) Polarität der Seitenkette	II. (nach Pelc) Struktur der Seitenkette	III. (nach Goldberg et al.) Freie Energie)$^{+}$ der Seitenkette Δ F/100
AUX → GUX	Ile / Met → Val	bleibt unpolar	bleibt $-CH_3$	+ 29,7 / + 13,0 → +16,9
ACX → GCX	Thr → Ala	polar → unpolar	$=C\begin{matrix}CH_3\\OH\end{matrix} \rightarrow -CH_3$	+ 4,4 → + 7,3
AAX → GAX	Asn → Asp Lys → Glu	bleibt polar	$-CONH_2 \rightarrow -COOH$ $-CH_2NH_2 \nearrow$	-0,1 → + 5,4 + 15 → + 5,5
AGX → GGX	Ser / Arg → Gly	polar → unpolar	bleibt ohne $-CH_3$-Gruppe	+0,4 / + 7,3 → 0

Mutagenen schwächer toxisch ist. Daraus erklärt sich seine geringe Inaktivierungswirkung. Seine mutagene Wirkung wird wahrscheinlich erst unter dem Einfluß der Sulfhydrylverbindungen an der DNS entfaltet.

)$^{+}$ Δ F/100 nach (162); posit. Werte als Maß d. Hydrophobie, negative als Maß d. Hydrophilie, Glycin als Nullpunkt (158)

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

Chemikalien

ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP) und PEP-Kinase,
Fa. C. F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim,
GTP, Fa. Calbiochem, Luzern

Poly-U, Poly-C, Poly-A,
Fa. Miles Chemical Co., Clifton, New Jersey (USA)

Aminosäuren mit verwendeter spez. Aktivität:

1-^{14}C-Phenylalanin 4,2 µC/µMol, 1-^{14}C-Lysin 8,1 µC/µMol, U-^{14}C-Prolin 5 µC/µMol, U-^{14}C-Glutaminsäure 5 µC/µMol, U-^{14}C-Arginin 5 µC/µMol, U-^{14}C-Leucin 6 µC/µMol, U-^{14}C-Serin 5,6 µC/µMol und

^{14}C-Methyl-hydrochlorid, 5,6-^{3}H-Uracil, Radiochemical Centre, Amersham, England

^{14}C-ATP ^{3}H-CTP und ^{14}C-ATP ^{3}H-Methylamin-hydrochlorid, New England Nuclear Corp., Boston (USA)

RNS-Polymerase aus Micrococcus lysodeikticus:

Miles Chemical Co., Elkhardt, Indiana, bzw. RNS-Polymerase aus E. coli B, präpariert nach Zillig et al. (165)

Häufig verwendete Geräte

Tricarb-Liquid-Scintillation-Spectrometer der Firma Packard Instrument Co., Inc. zur Messung ^{3}H- und ^{14}C-markierter Proben.

Zellhomogenisator, B. Braun & Co., Melsungen, Modell MSK und das Ultraschallgerät Sonifier (mit Mikrorüssel) der Firma Branson Instrumenta, Inc., Mauler-Nukleonik, Solingen-Ohligs, zum Zellaufschluß.

Kolorimeter nach Dr. B. Lange oder Photometer Eppendorf der Firma Netheler & Hinz, Hamburg, unter Verwendung des Nephelometrie-Filters, zur Messung der Trübungsextinktion ($E_{Trübung}$).

Spektrophotometer PMQ II und RPQ 20 A der Firma Zeiß, Oberkochen, zur Messung der UV-Spektren

Häufig gebrauchte Medien und Puffer

K 1: Minimalmedium für E. coli (für Platten)
1 l deion. Wasser, 3,5 g K_2HPO_4, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g Natriumcitrat, 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g Glucose, 20 g Agar

K 2: Komplettmedium für E. coli (für Platten und Schrägröhrchen)
1 l deion. Wasser, 15,0 g Nutrient Broth (Difco), 5,0 g NaCl, 20,0 g Agar

K 3: Hefeextrakt-Glucose-Medium p_H 6
1 l deion. Wasser, 3,2 g K_2HPO_4, 16,0 g KH_2PO_4, 10 g Glucose, 6,0 g Yeast Extract (Difco)

K 4: Komplettmedium (YEPD) für S. cerevisiae (für Platten)
1 l deion. Wasser, 10,0 g Yeast Extract (Difco), 10,0 g Pepton, 20,0 g Glucose, 20,0 g Agar

L 1: Phosphat-Puffer-Gemisch für die Mutationsauslösung p_H 6
1 l deion. Wasser, 3,2 g K_2HPO_4, 16,0 g KH_2PO_4 und 0,12 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

L 2: Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (166) von p_H 3 bis 8 enthält ein wechselndes Gemisch einer 0,1 m Citronensäure- und einer 0,2 m Na_2HPO_4-Lösung

L 3: Salzlösung
1 l deion. Wasser, 5,0 g NaCl und 0,12 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

Verwendete Stämme

Escherichia coli B,
Bacillus subtilis B 23,
Saccharomyces cerevisiae E 188, rote ad^--Mutante.

Radioaktivitätsmessungen

Die Proben wurden mehrmals 20 bzw. 10 Minuten gemessen und die Mittelwerte angegeben. Der absolute mittlere Fehler wurde nach

$$F_a = \pm \sqrt{\frac{N}{t^2} + \frac{L}{t_1^2}}$$

N = Gesamtimpulszahl in der Meßzeit t, L = Leerwertimpulszahl in der Meßzeit t_1 (167)

ermittelt und lag, wenn nicht besonders angegeben, unter 1%. Die Radioaktivität wurde i.allg. in Imp./20 Min. (Ip20M) oder in Imp./Min. (IpM) angegeben.

Als Szintillatorgemische dienten:

Dioxan-Szintillator
In 1 l Dioxan werden 120 g Naphthalin, 4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 75 mg POPOP (1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol) gelöst. 1 ml Testflüssigkeit sind mit 10 ml Szintillator vermischt worden.

Toluol-Szintillator
In 1 l Toluol werden 4 g PPO und 100 mg POPOP gelöst.

Proteinbestimmung nach Lowry (168)

Reagenzien:

A: 2%ige Lösung von Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH
B: 0,5%ige Lösung von $CuSO_4$ 5 H_2O, die 1 g Kaliumnatriumtartrat enthält
C: Vor Gebrauch werden 50 ml der Lösung A mit 1 ml der Lösung B vereinigt.

Für den Test wurden 0,2 ml der Probe mit 1,0 ml des Gemisches C geschüttelt und 10 Minuten stehen gelassen. Darauf erfolgte Zugabe von 0,1 ml Folin-Ciocalteau-Reagens. Nach Schütteln und 30 Minuten langem Stehenlassen wurde die Extinktion der blauen Lösung bei 740 nm im Spektrophotometer gemessen. Zur Absolutbestimmung des Proteins diente eine Eichkurve, die mit Hilfe verschiedener Konzentrationen einer Serumalbuminlösung gewonnen wurde.

1. Radioaktive Synthesen und Halbwertszeitbestimmung von NNMG und Mutationsversuche mit Mikroorganismen

1.1. Synthesen der radioaktiven NNMG-Verbindungen

Synthese von ^{3}H-Methyl-NNMG

In Anlehnung an die Vorschrift von McKay (18) wurden 2 mC/mMol ^{3}H-Methylamin-hydrochlorid (spez. Aktivität 30 mC/mMol), gelöst in Methanol, auf den Boden eines Dreihalskolbens pipettiert. Zur Reaktionslösung wurden 400 mg (0,013 Mol) Methylamin als 40%ige methanolische Lösung tropfenweise zugegeben. Darauf wurde das Reaktionsgemisch mit festem NNMG versetzt, so daß es insgesamt 2,5 g (0,017 Mol) enthielt. Nach Beendigung der Gasentwicklung sind die Kristalle des 1-Nitroso-3-methyl-guanidins abfiltriert worden. Die erhaltene Substanz wurde in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben in 1,8 ml konz. Salpetersäure (d = 1,42) unter Kühlung aufgelöst. Nach Zugabe von 8 ml Wasser wurde die Lösung unter ständigem Rühren im Eisbad innerhalb von 5 Minuten mit 800 mg Natriumnitrit (0,012 Mol), das in 1,25 ml Wasser gelöst war, versetzt. Nach 20 Minuten langem Rühren konnten die gelbgrünen Kristalle des ^{3}H-Methyl-NNMG abfiltriert und dann aus Methanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 0,81 g (43% d. Th., bez. auf Methylamin)
Spez. Aktivität: 180 µC/mMol

Synthese von ^{14}C-Methyl-NNMG

Die Synthese wurde mit 2 mC ^{14}C-Methyl-hydrochlorid in Äthanol (spez. Aktivität ca. 30 mC/mMol) in der gleichen Weise wie bei der Tritium-Verbindung durchgeführt, jedoch mit einem Zehntel

der Mengen. Das erhaltene ^{14}C-Methyl-NNMG wies die spez. Aktivität von ca. 2,0 mC/mMol auf und gelangte nach Waschen mit Wasser zur Verwendung.

1.2. Bestimmung der Halbwertszeit des NNMG

In 100 ml-Erlenmeyerkolben wurden 500γ NNMG/ml in 50 ml ca. 0,08 m Pufferlösung (L 2) verschiedener p_H-Werte bei 37° geschüttelt. Nach den entsprechenden Versuchszeiten wurde die Konzentration des NNMG aus der Extinktion bei 400 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt:

$$\varepsilon_\lambda = \frac{M}{c \cdot d} \log \frac{I_0}{I} = \frac{M}{c \cdot d} E$$

$$c = \text{konst} \cdot E \qquad (1)$$

Aus (1) und dem Zerfallsgesetz

$$c = c_0 \cdot e^{-k\Delta t} \qquad (2)$$

folgt, da $k = \frac{\ln E_0 - \ln E_1}{\Delta t}$ ist, für die Halbwertszeit

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} = \frac{\ln 2}{\ln E_0 - \ln E_1} \Delta t = \frac{0{,}6932 \cdot 0{,}4343}{\ln E_0 - \ln E_1} \Delta t$$

c = Konz. in mg/ml, d = Schichtdicke in cm, E = Extinktion bei 400 nm zu Versuchsbeginn, E_1 = Extinktion bei 400 nm bei Versuchsende, I_0 bzw. I = Intensität des auffallenden bzw. durchfallenden Lichtes, Δt = Versuchszeit, τ = Halbwertszeit

In Tab. 2 (Theoret. Teil 1.3.2.) wurden für jeden p_H-Wert die Mittelwerte der aus den Versuchen mit verschieden langen Versuchszeiten errechneten Halbwertszeiten angegeben.

Für alle Versuche ist E_0 = 0,592

p_H	E_1	t in Std.	τin Std.	p_H	E_1	t in Std.	τin Std.
3,0	0,553	1	10,2	5,5	0,530	5	31,5
	0,528	2	12,1		0,496	8	31,3
	0,450	5	12,6		0,456	12	31,8
	0,314	12	13,1		0,349	24	30,2
3,5	0,577	1	27,1		0,260	36	30,3
	0,561	2	25,8	6,0	0,538	2	14,5
	0,510	5	23,2		0,466	5	14,5
	0,495	8	31,0		0,402	8	14,3
	0,405	12	22,0		0,328	12	14,1
4,0	0,569	2	35,0	6,5	0,502	1	4,20
	0,539	5	36,9		0,477	2	4,94
	0,509	8	36,6		0,297	5	5,05
	0,465	12	34,5		0,204	8	5,20
4,5	0,509	8	36,5	7,0	0,430	1	2,17
	0,486	12	42,1		0,321	2	2,26
	0,386	24	39,0		0,136	5	2,35
	0,313	36	39,1	7,5	0,323	1	1,14
5,0	0,542	5	39,2		0,206	2	1,33
	0,511	8	37,7	8,0	0,224	1	0,71
	0,484	12	41,2		0,108	2	0,56
	0,398	24	41,8				
	0,317	36	39,9				

1.3. Bestimmung der Mutationsrate von E. coli B in Abhängigkeit vom p_H-Wert

Je 1 ml Zellsuspension einer Vorkultur von E. coli-Bakterien (Komplettmedium K 2 ohne Agar) wurden mit Salzlösung (L 3) zweimal gewaschen und 20 Minuten bei 37° in 2 ml 0,08 m Puffer (L 2) der p_H-Werte 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 5,5 und 6,0 mit 200γ NNMG/ml bei 37° inkubiert.

Bestimmung der Mutationsrate

Nach dem Waschen sind die Bakterien in verschiedenen Verdünnungen auf Komplettmedien (K 2) ausgeplattet worden. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit dem Lederberg-Stempel auf je eine Minimal- und dann auf eine Komplettplatte übertragen. Nach Bebrüten wurden von den Komplettplatten die Kolonien, die auf der Minimalplatte (K 1) kein Wachstum zeigten, abgeimpft und zur Kontrolle einem Strichtest unterworfen: Auxotrophe Mutanten waren am Ausbleiben des Wachstums auf dem Minimalagar zu erkennen.

1.4. Inaktivierung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei E. coli B

E. coli-Bakterien wurden im Komplettmedium (K 3) bei p_H 6 und 37° unter Schütteln bis zur Ruhephase vorgezüchtet. Die Zellen sind dann zweimal gewaschen und in 8 Erlenmeyer-Kolben zu je 50 ml Phosphat-Puffer (L 1) in einer Konzentration der Trübungsextinktion 1,0 (Eppendorf) mit 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml inkubiert worden. Nach Ablauf von 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 32 Stunden wurde 1/100 der Suspension zur Bestimmung der Mutations- und Abtötungsrate verwendet (s. 1.3.). Es sind durchschnittlich 600 Kolonien gestempelt worden. Die über 24 Stunden durchgeführte Nullwertskontrolle zeigte keine merkliche Abnahme an lebenden Bakterien.

Aus der übrigen Zellsuspension wurde durch dreimaliges Waschen die markierte Zellmasse gewonnen und in die Packard-Flaschen mit Äther quantitativ übergespült. Die Zellen wurden mit konz. Ameisensäure lysiert und nach Zugabe einer entsprechenden Menge Hyamin im Dioxan-Szintillator auf Radioaktivität geprüft.

1.5. Untersuchung der Abtötung, Mutationsrate und NNMG-Aufnahme in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli, S. cerevisiae und B. subtilis

Untersuchungen bei E. coli B

E. coli-Bakterien wurden nach 1.4. vorgezüchtet. Die gewaschenen Zellen wurden in je 50 ml 0,08 m Puffer (L 2) der p_H-Werte 3,5 bis 8,0 mit 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml 2 und 5 Stunden bei 37° ge-

schüttelt. Die Trübungsextinktion betrug 1,0 (Eppendorf) und änderte sich während der Inkubation nicht wesentlich.

Zur Bestimmung der Mutationsrate wurden für jeden p_H-Wert durchschnittlich 890 Kolonien getestet. Zur Ermittlung der NNMG-Aufnahme wurden 25 ml Bakteriensuspension pro Versuch verwendet.

Untersuchungen bei S. cerevisiae E 188 ad^- (rot)

Die Hefezellen wurden auf Komplettplatten (K 4) bei 30° vorgezüchtet. Der rote Farbstoff der Zellen war nach ca. 4 Tagen sichtbar. Die Zellen wurden in Salzlösung (L 3) suspendiert, zweimal gewaschen und in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in je 10 ml ca. 0,08 m Puffer (L 2) der p_H-Werte 3,5 bis 8,0 mit 250γ NNMG/ml 30 Minuten bei 30° inkubiert. Die Zellen sind dann gewaschen und auf Hefe-Komplettagar plattiert worden. Als Mutanten wurden die weißen Kolonien nach Abzug der Spontanmutanten gezählt. Pro p_H-Wert konnten durchschnittlich 260 Kolonien ausgewertet werden.

Zur Bestimmung der NNMG-Aufnahme wurden gleichartig vorgezüchtete Hefezellen für jeden p_H-Wert auf die Trübungsextinktion 1,0 (Eppendorf) gebracht. In ca. 0,08 m Puffer (L 2) erfolgte mit 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml bei 30° unter Schütteln eine 5stündige Inkubation. Die NNMG-Aufnahme wurde nach 1.4. ermittelt. Die Konzentrationsabnahme der Hefezellen war unwesentlich.

Bestimmung der NNMG-Aufnahme bei B. subtilis B 23

Die Bacillen wurden unter den gleichen Bedingungen wie E. coli-Bakterien in Gegenwart von 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml 4 Stunden inkubiert. Die NNMG-Aufnahme wurde nach 1.4. bestimmt. Im Gegensatz zu E. coli nahm die Zellkonzentration mit steigendem p_H-Wert stark ab. Daher wurde sie für die Ermittlung der NNMG-Aufnahme auf die Trübungsextinktion 1,0 (Eppendorf) umgerechnet. Sie betrug zu Versuchsbeginn 0,92.

NNMG-Aufnahme und Zellkonzentration von B. subtilis in Abhängigkeit vom p_H-Wert

p_H	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
NNMG-Aufn. in Ip20M	54	137	255	346	386	548	701	446
$E_{Trübung}$	0,94$^+$	0,92	0,85	0,83	0,77	0,73	0,69$^+$	0,65$^+$
NNMG-Aufn. in Ip20M/OE	58	149	300	417	500	751	906	689

)$^+$ Extinktion extrapoliert

1.6. NNMG-Aufnahme bei E. coli B im Komplettmedium

Die nach 1.4.vorgezüchteten E. coli-Bakterien wurden bei 37° unter Schütteln in 50 ml Medium folgender Zusammensetzung 5 Stunden inkubiert: 10 g Glucose, 6 g Hefe auf 1 l ca. 0,08 m Puffer (L 2) der p_H-Werte 4,5 bis 8,0. Das Medium enthielt 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml. Das Wachstum der Bakterienpopulation wurde durch Messung der Trübungsextinktion verfolgt. Sie betrug zu Beginn des Versuchs 0,66 (Lange). Die Bestimmung der NNMG-Aufnahme erfolgte nach 1.4.

2. Ausführung von Modellversuchen an NNMG-behandelten Nucleinsäuren mit Protein- und RNS-Synthesesystemen

2.1. Versuche mit dem Proteinsynthesesystem

2.1.1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung der Ribosomen- und S 100-Fraktionen

Für die Vorkultur und die Züchtung der Bakterien von Escherichia coli B wurde folgendes Kulturmedium verwendet:

8,5 g K_2HPO_4
11,0 g KH_2PO_4
10,0 g Glucose
6,0 g Yeast Extract (Difco) in
1 l deion. Wasser

Das sterilisierte Medium wurde mit einer Vorkultur von E. coli beimpft. Die Inkubation erfolgte unter Belüftung oder Schütteln bei 37°. Das Bakterienwachstum wurde mit Hilfe der Trübungsmessung (Lange) verfolgt und in der frühen log-Phase durch schnelles Abkühlen im Eisbad unterbrochen. Nach Abzentrifugieren in der Kühlzentrifuge wurden die Bakterien zweimal mit Puffer gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Puffer (p_H 7,8) zum Waschen der Bakterien

10 mMol Tris (hydroxymethyl)aminomethan
10 mMol Magnesiumacetat
60 mMol KCl auf
1 l dest. Wasser.

Extraktionspuffer

wie Waschpuffer, aber mit Zusatz von 6 mMol ß-Mercaptoäthanol.

Die Bakterien wurden mit dem 2,5fachen Volumen der Bakterienmasse im Extraktionspuffer suspendiert, mit 1,5facher Gewichtsmenge Glasperlen vermischt und ca. 2 Minuten im Zellhomogenisator (Braun) bei etwa 0° zerrieben. Bei 30 000 g wurden Zelltrümmer und Glasperlen 20 Minuten bei 2° in der Sorvall-Kühlzentrifuge (Rotor SS34) abzentrifugiert. Die überstehende Lösung ist dann dekantiert, mit 3γ DNase/ml versetzt und nochmals 30 Minuten bei 30 000 g zentrifugiert worden. Zur Gewinnung der Ribosomen ist die so erhaltene S30-Fraktion bei 100 000 g zwei Stunden in der Ultrazentrifuge (Spinco L 50, Rotor 40) zentrifugiert worden. Die oberen zwei Drittel des Überstandes wurden abpipettiert und lieferten die S100-Fraktion,

die eingefroren aufbewahrt wurde. Das Sediment ist in Extraktionspuffer suspendiert und zur Reinigung nochmals bei 100 000 g zwei Stunden zentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen. Die so erhaltenen Ribosomen wurden in einem Viertel des ursprünglichen Volumens mit Extraktionspuffer resuspendiert, nochmals bei 4000 g zehn Minuten zentrifugiert und eingefroren aufbewahrt.

2.1.2. Behandlung der Nucleinsäuren mit NNMG

Die synthetischen Polynucleotide und die tRNS wurden mit 10^{-3} Mol/l NNMG in m/15 Phosphatpuffer bei p_H 5,5 behandelt. Die Proben sind ebenso wie die Kontrollproben ohne NNMG 18 Stunden bei 37° unter Schütteln inkubiert und dann 6 Stunden durch Dialyse gegen deion. Wasser gereinigt worden. Die Nucleinsäuren wurden darauf mit Alkohol ausgefällt und lyophilisiert.

2.1.3. Das Aminosäureeinbausystem

In Anlehnung an das Einbausystem von Nirenberg und Matthaei (56) enthielt das Reaktionsgemisch (p_H 7,8) in 1 ml:

100 µMol Tris (hydroxymethyl)aminomethan
10 µMol Magnesiumacetat
50 µMol KCl
5 µMol Phosphoenolpyruvat
5 µMol ATP
ca. 0,02 µMol einer radioaktiven Aminosäure
0,05 ml Fraktion S100
0,05 ml Ribosomenfraktion (i.a. ca. 500 γ Protein, bestimmt nach der Methode von Lowry)
0,05 µMol GTP
20 γ Phosphoenolpyruvatkinase

Dazu kamen pro ml 80 γ Poly-U
bzw. 350 γ Poly-C
bzw. 120 γ Poly-A oder Poly-AG
bzw. 250 γ tRNS

Das Gesamtvolumen betrug 0,25 ml.
Das Reaktionsgemisch wurde 10 bzw. 20 Minuten bei 37° inkubiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach Methoden von Mans und Novelli (168):

0,1 ml Reaktionsgemisch wurde auf ein Filterblättchen aufgetragen und getrocknet. Die Präzipitation des Proteins auf den Blättchen geschah in verd. Säure (3 ml/Blättchen). Für Poly-U wurde 10%ige, für Poly-C 20%ige Trichloressigsäure und für Poly-A ein Gemisch von 10%iger Trichloressigsäure und 0,5%iger Wolframsäure verwendet. Nach ca. 30 Minuten konnten die Filterblättchen getrocknet und dann mit heißer (60°) und kalter verdünnter Säure (5%ige Trichloressigsäure für Poly-U bzw. 15%ige für Poly-C und ein Gemisch aus 5%iger Trichloressigsäure und 0,25%iger Wolframsäure bei Poly-A) behandelt werden. Dann sind die Blättchen noch mit einem Alkohol-Äther-Gemisch (1 : 1) bei 37° und Raumtemperatur behandelt worden. Nach jedem Behandlungsschritt wurden Filterblättchen getrocknet und schließlich in Packard-Flaschen mit 7 ml Toluol-Szintillator pro Blättchen im Packard-Scintillation-Spectrometer auf Radioaktivität geprüft.

2.2. Bestimmung der Transfer- und der Akzeptoraktivität

Die Bestimmung der Transferaktivität erfolgte nach der gleichen Methode wie bei der Proteinsynthese, jedoch mit NNMG-behandelter und unbehandelter tRNS sowie mit unbehandelten Poly-U, Poly-C Und Poly-A. Die tRNS wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in m/15 Phosphatpuffer nach Sörensen (Gemisch der zwei Lösungen m/15 KH_2PO_4 und m/15 $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (166)) bei p_H 5,5 und 37° mit 10^{-2} Mol/l NNMG-Lösung eine Stunde geschüttelt und nach 16stündiger Aufbewahrung bei 2° durch Dialyse gegen deion. Wasser gereinigt. In gleicher Weise wurde eine Kontrollprobe von tRNS behandelt, aber ohne Zusatz von NNMG.

Die Bestimmung der Akzeptoraktivität wurde nach v. Ehrenstein et al. (170) vorgenommen. Die tRNS ist aus der S100-Fraktion des Bakterienextraktes über eine DEAE-Zellulose-Säule (2,5 · 5 cm) entfernt worden, nachdem das Adsorbens vorher mit 0,1 m

Tris (hydroxymethyl)aminomethan/HCl-Puffer, p_H 7,5, der 0,006 m ß-Mercaptoäthanol enthielt, ins Gleichgewicht gebracht worden war. Das Eluat wurde über Nacht durch Dialyse gegen folgenden Puffer gereinigt: 10 mMol Tris/HCl, p_H 7,5, 10mMol $MgCl_2$, 60 mMol KCl und 6 mMol ß-Mercaptoäthanol auf 1 l deion. Wasser. Die Inkubation wurde ähnlich wie bei der Proteinbiosynthese durchgeführt, jedoch ohne Ribosomenfraktion und mit der von tRNS befreiten S100-Fraktion. Den Versuchsansätzen sind anstelle der tRNS die NNMG-behandelten bzw. unbehandelten Transfer-Ribonucleinsäuren und die entsprechenden Polynucleotide zugesetzt worden. Die Proben wurden 10 Minuten bei 37° inkubiert. Die Präzipitation ist dann mit 10%iger und die Befreiung von nicht gebundenen radioaktiven Aminosäuren mit 5%iger Trichloressigsäure vorgenommen worden.

2.3. Versuche mit dem Polymerasesystem

Präparation der DNS

Die DNS wurde in deion. Wasser bei 4° vorsichtig gelöst und in m/30 Phosphatpuffer bei p_H 6 in Gegenwart von 500 µl NNMG/ml (3,4 µMol) unter Schütteln 3, 6, 12 und 18 Stunden inkubiert. In gleicher Weise wurde der Versuch mit ^{3}H-Methyl-NNMG durchgeführt. Die Nucleinsäuren sind dann über Nacht durch Dialyse gegen deion. Wasser bei 4° von NNMG befreit und in Kochsalzlösung aufbewahrt worden. Die Radioaktivität der markierten Nucleinsäuren wurde dann im Dioxan-Szintillator gemessen. Die unmarkierte DNS diente als Starter-DNS im RNS-Polymerasesystem.

Das RNS-Synthesesystem

In Anlehnung an Methoden von Zillig et al. (165) enthielt das Reaktionsgemisch auf 0,5 ml:

15 µMol Tris/HCl, p_H 7,9
65 µMol NH_4Cl
15 µMol Magnesiumacetat
0,5 µMol je von Guanosin-5'-triphosphat, Uridin-5'-

	triphosphat und Cytidin-5'-triphosphat oder Adenosin-5'-triphosphat
0,25 µMol	Cytidin-5'-triphosphat oder Adenosin-5'-triphosphat der spez. Aktivität ca. 700 bis 1000 IpM/mµMol
1 µMol	Phosphoenolpyruvat (PEP)
10 µg	PEP-Kinase
25 µg	DNS, die verschieden lange mit NNMG behandelt wurde
0,02 ml	Polymerase (40γ Protein) in Glycerin

Das Gemisch wurde in Plastikröhrchen 20 Minuten bei 37° inkubiert. Die Fällung erfolgte unter Eiskühlung durch Zugabe von 0,05 ml einer 1,2%igen Serumalbuminlösung. Dann wurde zweimal mit 10%iger Perchlorsäure und einmal mit einem Äther-Alkohol-Gemisch (1 : 1) 10 Minuten bei 12 000 g in der Sorvall-Kühlzentrifuge (Rotor SS34) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Der so gewaschene Niederschlag ist dann mit 1 ml 1,5 m Ammoniak-Lösung bei 37° in 20 Minuten gelöst worden. Das Gemisch wurde mit 10 ml Dioxan-Szintillator versetzt und die Radioaktivität im Packard-Scintillation-Spectrometer gemessen.

3. Experimente zur Methylierung der Nucleinsäuren in vitro und in vivo

3.1. Methylierungen der Nucleinsäuren in vitro

1,0 mg Nucleinsäure (Poly-C, Poly-U, DNS oder tRNS) und 500γ ^{3}H-Methyl-NNMG (3,4 µMol) wurden in 1,25 ml 0,05 m Puffer (Gemisch der zwei Lösungen 0,05 m Citronensäure und 0,05 m Natriumcitrat (166)) bei p_H 6 und 37° 12 und 18 Stunden geschüttelt. Die Reinigung der Nucleinsäuren erfolgte durch Dialyse gegen deion. Wasser oder durch Säulenchromatographie über Sephadex G 200 (1,8 x 136 cm). Als Lösungsmittel diente folgender Puffer: 1 l deion. Wasser, 6,0 g Tris, 1,0 g Titriplex III; die Lösung wurde mit Salzsäure auf p_H 7,2 eingestellt. Die Radioaktivität ist im Dioxan-Szintillator gemessen worden.

Der Prozentsatz der umgesetzten Methylgruppen wurde für die 18 Stunden mit 500γ ^{3}H-Methyl-NNMG (3,4 uMol = 1,4·10^{6}Zerf./Min.) umgesetzten Nucleinsäuren auf Grund von 22,5% Zählausbeute für Tritium ermittelt:

	Ip20M/mg Nucleinsäure	Methylierungsausbeute in %
tRNS	7573 (≙ 1,7·10^{3}Zerf./Min)	0,12
Poly-C	4388	0,069
Poly-A	2718	0,043
Poly-U	2448	0,039
DNS	2669 (Vers. n. 2.3.)	0,042

Für die Kinetik der Methylierung der tRNS sowie zur Untersuchung der p_H-Abhängigkeit ist 0,05 m Puffer (L 2) verwendet worden.

3.2. Nachweis der Methylderivate der Nucleobasen

Methylierung der Nucleobasen und Polyribonucleotide

Als Reaktionslösung diente 0,08 m Puffer (L 2) vom p_H 6. 1 mg Base (Adenin oder Cytosin) bzw. 1 mg RNS (Poly-A, Poly-C oder Poly-UG) wurde mit 0,3 bis 1,0 mg ^{14}C-Methyl-NNMG 24 bis 48 Stunden bei 37° geschüttelt. Die Nucleinsäuren sind dann 10 Stunden gegen deion. Wasser dialysiert worden. Die Polyadenylsäure bzw. Poly-UG wurde 2 Stunden bei 100° in 1n Salzsäure hydrolysiert. Die Hydrolyse der Polycytidylsäure erfolgte in 2 Stunden in 20%iger Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr bei 120° im Autoklaven (171).

Chromatographie und Identifizierung der Methylierungsprodukte

Die Identifizierung der Methylierungsprodukte wurde auf Dünnschichtplatten mit Zellulose MN400 (Macherey, Nagel & Co., Düren) durch Cochromatographie mit Vergleichssubstanzen verschiedener Herkunft in mehreren Laufsystemen durchgeführt. Substanzflecke, die sich durch Löschung bei 254 nm zu erkennen gaben, wurden ausgekratzt und direkt oder nach Rechromatographie in mehreren

Laufsystemen mit 7 ml Dioxan-Szintillator im Packard-Scintillation-Spectrometer auf Aktivität geprüft. Zur Erfassung der Aktivitätspeaks wurden ebenfalls gleich große benachbarte Zonen des Substanzflecks untersucht.

Chromatographiesysteme (v/v/v)

S 1: n-Butanol-Äthanol-Wasser (5 : 2 : 3)
S 2: n-Butanol-Wasser-Eisessig (4 : 1 : 1)
S 3: n-Butanol (wasserges.)-Ammoniak (100 : 1)
S 4: 3% NH_4Cl in Wasser
S 5: Äthanol-Wasser-Ammoniak (80 : 8 : 2)
S 6: Methanol-konz. Salzsäure-Wasser (7 : 2 : 1)

Chromatographie der Nucleobasen

Adenin

Substanz	R_F-Werte Radioaktivität in IpM S 1	S 2	S 3	S 4
Adenin	0,50	0,50	0,48	0,26
1-Methyl-adenin	0,27 51,9±1,1	0,15 3112	0,32 236	0,68 308
3-Methyl-adenin	0,40 198	0,36 356	0,15 347	0,61 36,6±1,1
N^6-Methyl-adenin	0,73 13,9±1,0	0,68 164	0,70 101	0,35 21,9±1,1)+ 6,0±0,9)+
1-Nitro-3-methyl-guanidin	0,66 2650	0,63 52470	0,64 36263	0,81 2136

)+ durch Rechromatographie erhaltene Werte

Polyadenylsäure

Substanz	R_F-Werte Radioaktivität in IpM S 1	S 2	S 3	S 4
Adenin	0,45	0,51	0,48	0,26
1-Methyl-adenin	0,21 15,5±1,0	0,14 72	0,34 10,1±0,9	0,62 10,9±0,9
3-Methyl-adenin	0,35 11,5±1,3	0,36 4,0±0,8)+	0,15 10,6±0,9	0,62 10,9±0,9
N^6-Methyl-adenin	0,63 3,9±0,6	0,68 7,9±1,2	0,70 8,8±0,9	0,34 3,6±0,7

Cytosin

	S 2	S 4)++	S 5	S 6
Cytosin	0,20	0,70	0,24	0,36
3-Methyl-cytosin	0,26 382 47,4±1,2	0,77	0,42 29,5±1,1	0,55 36,1±1,2
1-Methyl-cytosin	0,15 644 7,3±0,6	0,84	0,50 43,2±1,2	0,64 8,3±0,9
1-Nitro-3-methyl-guanidin	0,60	0,70	0,58	0,78

Polycytidylsäure

	S 2	S 4	S 5	S 6
Cytosin	0,20	0,70	0,24	0,38
1-Methyl-cytosin	0,15 19,8±1,0	0,84 92,7±0,8	0,49 53,4±0,8	0,64 27,8±0,4

)+ durch Rechromatographie erhaltene Werte

)++S 4 diente zur Vortrennung, Rechromatographie in den übrigen Systemen

Polyuridylguanylsäure

Substanz	R_F-Werte Radioaktivität in ipM		
	S 4	S 5	S 6
Guanin	0,46	0,09	0,14
7-Methyl-guanin	0,64 9,6±0,9	0,17 7,3±0,8	0,19 9,1±0,8

3.3 Methylierung der Nucleinsäuren in vivo

3.3.1. Inkubation der Bakterien in Komplettmedium und in Pufferlösung

Inkubation in Komplettmedium

E. coli-Bakterien wurden nach 1.4. vorgezüchtet und in je 500 ml Komplettmedium (K 3, p_H 6) 2 und 5 Stunden bei 37° in Gegenwart von 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml inkubiert. Die Trübungsextinktion (Lange) der Zellsuspension betrug zu Beginn des Versuchs und nach 2 Stunden 1,85 und nach 5 Stunden 2,00. Zur Gewinnung des S30-Überstandes wurden die Zellen mit Ultraschall 2 - 3 Minuten aufgeschlossen.

Inkubation in Pufferlösung

In Phosphatpuffer (L 1) wurden nach 1.4. vorgezüchtete E. coli-Bakterien mit der Trübungsextinktion 1,0 (Eppendorf) bei p_H 6 und 37° unter Zusatz von 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml 2 Stunden geschüttelt. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie bei den Versuchen mit Komplettmedium.

3.3.2. Die Trennung der Nucleinsäuren und des Proteins mit Hilfe des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten

4,48 g CsCl wurden in 3 ml 0,05 m Tris/HCl-Puffer, p_H 7,4 gelöst und mit 0,5 ml S30-Überstand verrührt. Nach 48stündiger

Zentrifugation bei 38 000 UpM im Rotor SW39 der Spinco-Ultrazentrifuge L 50 ist der Inhalt der Zentrifugenbecher durch Austropfen in Fraktionen zu 4 bzw. 8 Tropfen aufgeteilt worden. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 260 und 280 nm. Das CsCl wurde durch Dialyse gegen deion. Wasser entfernt und die Aktivitätsmessung mit Dioxan-Szintillator vorgenommen.

Zur Charakterisierung der durch die Dichtegradientenzentrifugation getrennten RNS und DNS der S30-Fraktionen wurden die Extinktionsverhältnisse der entsprechenden Fraktionen bestimmt.

	Kontrollversuch n. 2 Std.			Bakterien 2 Std. m. NNMG behdlt.			Bakterien 5 Std. m. NNMG behdlt.		
	RNS	DNS	Protein	RNS	DNS	Protein	RNS	DNS	Protein
$\frac{E_{280}}{E_{260}}$	0,46	0,52	1,1	0,46	0,51	1,4	0,46	0,51	1,4
$\frac{E_{290}}{E_{260}}$	0,19	0,21		0,19	0,21		0,19	0,20	
$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	0,91	0,91		0,91	0,90		0,90	0,90	

4. Versuche zur Inaktivierung und Resistenzausbildung durch NNMG bei E. coli

4.1. Untersuchungen der Nucleinsäuresynthese-Hemmungen durch NNMG

Eine nach Abschnitt 3.3.1. hergestellte Bakteriensuspension von E. coli B wurde auf die Trübungsextinktion 0,10 (Lange) eingestellt und mit 50 µC 5,6-^{3}H-Uracil auf 500 ml versetzt. Die Zellsuspension ist dann in Gegenwart von 30 γ NNMG/ml bei 37° geschüttelt worden. Nach 2 Stunden zeigten die NNMG-behandelten Zellen noch kein Wachstum (Trübungsextinktion 0,10)

im Gegensatz zum NNMG-freien Kontrollversuch (Trübung 0,20). Nach 5stündiger Inkubation war bei den behandelten Bakterien ein geringes Wachstum festzustellen (Trübung 0,125). Die geernteten Bakterien wurden nach 2.1.1. aufgeschlossen. Die S30-Überstände der drei Versuche wurden durch Verdünnen auf eine annähernd gleiche Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm gebracht, der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation nach 3.3.2. unterworfen und weiter verarbeitet.

4.2. Proteinbiosynthese mit Ribosomen aus behandelten Bakterien

E. coli-Bakterien wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei 3.1. in Gegenwart von 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml gezüchtet. Die Bakterien sind nach 5 Stunden nach Abkühlung mit Eiswasser geerntet worden. Für den Kontrollversuch wurde das Wachstum unbehandelter Bakterien in der frühen log-Phase unterbrochen. Die Aufarbeitung zu den Ribosomen- und S100-Fraktionen erfolgte wie bei 2.1.1. angegeben. Die einzelnen Fraktionen aus NNMG-behandelten und unbehandelten Bakterien wurden durch Verdünnen mit Extraktionspuffer auf gleichen Proteingehalt gebracht.

Die Proteinbiosynthese wurde mit radioaktivem Lysin und Poly-A als Messenger-RNS nach der unter 2.1.3. angegebenen Methode ausgeführt.

4.3. Untersuchung der Ribosomen aus NNMG-behandelten Bakterien

4.3.1. Isolierung der Ribonucleinsäuren

E. coli-Bakterien wurden, wie bei 3.3.1. beschrieben, mit ^{3}H-Methyl-NNMG im Komplettmedium inkubiert und nach 5 Stunden mit Eiswasser rasch abgekühlt und gewaschen.

In Modifizierung der RNS-Isolierung nach Georgiev et al. (172) wurden 5 g Bakterien mit 10 ml Waschpuffer und 5 g Glasperlen unter Zusatz von 1,2 ml 25%iger Natriumdodecylsulfatlösung vermischt, 10 Minuten bei 60^{o} gehalten und dann 30 Sekunden mit dem Braun-Homogenisator vollends aufgeschlossen. Nach 30 Min.

langem Zentrifugieren bei 31 000 g in der Sorvall-Kühlzentrifuge (Rotor SS34) wurde die klare Lösung bei 60° mit einem Phenol-Wasser-Gemisch (80 : 20) im Verhältnis 1 : 1 behandelt. Nach einstündigem Schütteln bei 4° ist 20 Minuten bei 39 000 g zentrifugiert worden, wobei eine Phenol- und Proteinphase entstand. Die Phenolphase, die die Nucleinsäuren enthielt, wurde viermal zur Phenolentfernung ausgeäthert und mit Preßluft von Äther befreit. Die Nucleinsäuren sind dann in 0,12 m Kochsalzlösung gelöst und mit 2 Volumina kaltem Alkohol bei 4° geschüttelt worden. Die ausgefällten Nucleinsäuren wurden bei 2 000 g 10 Minuten abzentrifugiert und dann in wenig Wasser gelöst. Die Trübung wurde durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei 39 000 g beseitigt und die klare Nucleinsäurelösung dann bei 4° mit 2 Vol. kaltem Isopropanol vorsichtig überschichtet. Nach abermaligem 10 Minuten langem Zentrifugieren bei 1 000 g sind die Nucleinsäuren in 0,15 m Kochsalzlösung gelöst aufbewahrt worden. Für den Kontrollversuch wurden Bakterien ohne NNMG gezüchtet, in früher log-Phase geerntet und in gleicher Weise aufgearbeitet.

4.3.2. Die Saccharose-Gradientenzentrifugation

Der Saccharose-Gradient wurde mit Hilfe eines Mischgeräts aus jeweils 12,5 ml einer 40%igen und einer 5%igen Saccharose-Lösung hergestellt. Die Gradientenflüssigkeit (p_H 5,1) enthielt außer Saccharose pro 1 l

0,01 Mol Natriumcitrat
0,1 Mol NaCl
0,001 Mol ÄDTA.

0,75 ml der zu untersuchenden Ribonucleinsäurelösung wurden vorsichtig auf den Spiegel der Gradientenflüssigkeit pipettiert und bei 3° 14 Stunden bei 25 000 UpM mit dem Rotor SW25 der Ultrazentrifuge (Spinco L 50) zentrifugiert. Die durch Austropfen gewonnenen 30-Tropfen-Fraktionen sind dann im Zeiß-Spektrophotometer bei 260 nm gemessen und in Dioxan-Szintillator auf Radioaktivität geprüft worden.

4.4. Untersuchung der Resistenzausbildung durch NNMG

Wachstum und NNMG-Aufnahme im Komplettmedium

Unbehandelte und 32 Stunden mit 30γ NNMG/ml in Hefeextrakt-Glucose-Medium K 3 (p_H 6, 37°) vorbehandelte E. coli-Bakterien wurden im gleichen Komplettmedium unter gleichen Bedingungen in Gegenwart von 30γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml gezüchtet. Das Wachstum der Populationen wurde durch Trübungsmessung verfolgt und zu verschiedenen Zeiten die NNMG-Aufnahme nach 4.4. bestimmt. Parallel zu diesen Versuchen wurde das Wachstum von nicht vorbehandelten und 32 Stunden vorbehandelten Bakterien im Komplettmedium ohne Zusatz des Mutagens beobachtet.

Bestimmung von Mutationsrate, Abtötungsrate, NNMG-Aufnahme und Methylierung der Nucleinsäuren bei ruhenden Zellen

E. coli-Bakterien wurden wie im Versuch mit Komplettmedium 32 Stunden vorbehandelt. Ein Teil der Bakterien wurde unter gleichen Bedingungen weitere 32 Stunden unter Zusatz frischer NNMG-Lösung vorgezüchtet. Die beiden vorbehandelten Bakterienpopulationen und unbehandelte Bakterien wurden darauf unter Zugabe von 20γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml in 0,08 m Pufferlösung (L 2) bei p_H 6 und 37° unter Schütteln 4 Stunden inkubiert. Mutationsrate und Inaktivierung wurden nach Abschnitt 1.3. und die NNMG-Aufnahme nach 1.4. bestimmt. Zur Ermittlung der Mutationsrate wurden für jeden Versuch durchschnittlich 280 Kolonien ausgewertet. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte 2 - 3 Minuten durch Ultraschall.

Die Extinktionswerte bei 260 nm der RNS und DNS wurden von drei Gradientenfraktionen je Versuch mit Hilfe einer Eichkurve auf 1 mg Nucleinsäure umgerechnet.

NNMG-Aufnahme und Methylierung der RNS und DNS von E. coli nach 4stündiger Behandlung mit ^{3}H-Methyl-NNMG

Bakterien	NNMG-Aufnahme in Ip20M	in %	Methylierung der Nucleinsäuren E_{260}	10^3 Ip20M/mg RNS	E_{260}	10^3 Ip20M/mg DNS
			1,555	5,4	0,490	4,8
unbe-			0,865	4,8	0,570	5,2
handlt.			0,285	4,9	0,422	5,4
	5981	100	Mittel	5,0	Mittel	5,1
32 Std.			2,125	3,6	0,365	3,4
behdlt.			2,041	3,8	0,805	4,4
			0,485	3,7	0,650	4,7
	4985	83	Mittel	3,7	Mittel	4,2
64 Std.			1,641	2,8	0,526	3,0
behdlt.			1,132	3,2	0,665	3,1
			0,556	2,7	0,556	3,7
	2959	50	Mittel	2,9	Mittel	2,9

5. Versuche zur Deutung des Mutationsoptimums durch die Methylierung mit Hilfe von Sulfhydrylverbindungen

5.1. Untersuchung der Methylierung der DNS in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert

Nach 1.4. vorgezüchtete E. coli B-Bakterien wurden in je 150 ml 0,08 Pufferlösung (L 2) bei den p_H-Werten 5, 6 und 7 bei 37° in Gegenwart von 20γ ^{14}C-Methyl-NNMG/ml (spez. Aktivität 0,10 mC/mMol) geschüttelt. Die Trübungsextinktion der Bakteriensuspension betrug 0,94 (Eppendorf) und hatte sich während der Inkubation nicht wesentlich verändert. Zur Ermittlung der spezifischen Methylierung der DNS wurde ein S30-Überstand mit Hilfe des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten analysiert (s. 3.3.). Drei DNS-Fraktionen kamen je p_H-Wert zur Auswertung. Die Extinktionen wurden auf 1 mg DNS mit Hilfe einer Eichkurve umgerechnet.

Die Methylierung der DNS von E. coli B in vivo in Abhängigkeit vom p_H-Wert

p_H	E_{260}	Ip20M	Methylierung der DNS in 10^3Ip20M/mg DNS	Mittel	NNMG-Aufn., bez. auf p_H 6	Methylierung d. DNS bei p_H-unabhängiger NNMG-Aufnahme in 10^3Ip20M/mg DNS	p_H-unabhängiger NNMG-Aufnahme in % bez. auf p_H 6
	0,470	457	4,47				
5	0,348	347	4,68	4,35	70,1	6,22	79,5
	0,320	266	3,91				
	0,495	805	7,63				
6	0,505	874	8,12	7,81	100	7,81	100
	0,430	702	7,68				
	0,445	659	6,95				
7	0,420	559	6,62	6,77	92,8	7,30	93,4
	0,395	568	6,74				

5.2. Bestimmung der Mutationsrate und der Mutanten

Die Behandlung der Bakterien für die Bestimmung der Inaktivierung und der Mutationsrate bis zum Strichtest erfolgte nach 1.3.

Bestimmung der Mutationsrate und der Inaktivierung bei E. coli B nach 5stündiger Einwirkung von ^{14}C-Methyl-NNMG

p_H	Mutanten in %	Überlebende in %	getestete Kolonien
5	13,6	0,14	787
6	18,8	0,084	500
7	16,4	0,11	604

Die auxotrophen Mutanten wurden mit Hilfe des Blättchentestes auf den Nährstoffbedarf geprüft. Hierzu wurden die Mutanten vorgezüchtet und in Platten mit Minimalagar suspendiert. Auf die erstarrten Medien sind sterile Filterblättchen aufgetragen worden, die Gemische von Aminosäuren, Nucleobasen und Vitaminen enthielten.

Gruppen für den Blättchentest

Gruppe 1: L-Cystin, L-Methionin, L-Serin, Glycin

Gruppe 2: L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Threonin, L-Lysin

Gruppe 3: L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, p-Aminobenzoesäure, Pyridoxin/HCl, Nicotinsäureamid

Gruppe 4: L-Glutaminsäure, L-Glutamin, L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Alanin, L-Prolin

Gruppe 5: Thiamin (B_1), Riboflavin (B_2), Ca-Pantothenat, Biotin, Folsäure, Cobalamin (B_{12})

Gruppe 6: Adenin, Guanin, Uracil, Thymin, L-Arginin, L-Histidin

Die Zellvermehrung um die Blättchen zeigte den Wachstumsbedarf an. Nach dem Gruppentest ergab der Einzeltest den genauen Nährstoffbedarf.

Von den bei p_H 5, 6 und 7 getesteten 106, 94 und 99 Mutanten wurden 25, 23 bzw. 20 nicht identifiziert. Die genaue Prüfung führte zu folgenden Mutanten (Mutantenzahl hinter den zugehörigen p_H-Werten und Substanzen angeführt):

Monoauxotrophe Mutanten p_H5; 6; 7 (31; 30; 25)
L-Cystin: 3; 5; 2, L-Methionin: 6; 2; 3, L-Serin: 0; 1; 1, Glycin: 0; 1; 0, L-Leucin: 2; 0; 1, L-Isoleucin: 4; 3; 1, L-Threonin: 0; 3; 0, L-Lysin: 1; 1; 1, L-Tyrosin: 1; 0; 0, L-Phenylalanin: 0; 0; 1, L-Tryptophan: 1; 3; 2, p-Aminobenzoesäure: 1; 0; 0, Nicotinsäureamid: 0; 0; 1, L-Alanin: 1; 0; 0, L-Prolin: 3; 0; 1, Thiamin: 0; 1; 0, Adenin: 2; 0; 1, Guanin: 2; 2; 1, Uracil: 2; 1; 0, L-Arginin: 0; 7; 6, L-Histidin: 2; 0; 3

Polyauxotrophe Mutanten:

p_H 5 (13): Cystin + Ile (5); Met + Ile; Met + Arg; Ser + Arg; Ser + His; Ile + Val; Tyr + Phe (2); Leu + Ile + Val

p_H 6 (10): Cystin + Adenin; Cystin + Arg (3); Ile + Val (3); Val + Thr; Tyr + Phe; Cystin + Met + Ser + Adenin + Guanin

p_H 7 (12): Cystin + Adenin; Met + Arg; Ser + Adenin; Leu + Ile; Ile + Val (7); Uracil + Arg

Mutanten mit variablem Nährstoffbedarf:

p_H 5 (25): Cystin, Met (5); Cys, Leu; Cys, Adenin; Cystin, Guanin; Met, Cobalamin (2); Ser, Gly; Tyr, Phe; Tyr, Adenin; Trp, Arg; Glu, Gln; Met, Ile, Thiamin; Glu, Gln, Asp; Glu, Gln, Asn; Adenin, Guanin, His; Glu, Gln, Asp, Asn (2); Cystin, Ile, Thr, Ala, Adenin; Gly, Ile, Val, Tyr, Thiamin; Leu, Ile, Val, Adenin, Guanin; Leu, Glu, Asp, Asn, Adenin, Arg

p_H 6 (22): Cystin, Met; Cystin, Adenin; Met, Cobalamin (2); Ser, Thr; Gly, Thr; Glu, Gln; Asp, Asn; Adenin, Guanin (9); Adenin, Arg; Gln, Asp, Asn; Cystin, Met, Ser, Arg; Glu, Gln, Asp, Asn (2)

p_H 7 (28): Cystin, Met (2); Met, Leu; Met, Cobalamin (2); Met, Arg; Ile, Thr; Tyr, Phe; Glu, Gln; Adenin, Guanin (3); Adenin, Arg; Arg, His (2); Cystin, Met, Ser; Met, Leu, Thiamin; Met, Lys, Cobalamin; Met, Trp, Adenin; Met, Thiamin, Cobalamin; Ser, Gly, Leu; Adenin, Guanin, His (2); Cystin, Met, Ser, Cobalamin; Glu, Gln, Asp, Asn; Met, Gly, Leu, Val, Thiamin; Met, Leu, Ile, Val, Tyr, Thiamin; Cystin, Met, Thr, Tyr, Trp, p-Aminobenzoesäure, Pyridoxin/HCl, Nicotinsäureamid, Thiamin, Riboflavin, Biotin, Pantothensäure, Folsäure, Cobalamin

Mutanten mit Wachstumshemmung

p_H 5: L-Cystin, L-Tyrosin (2);

p_H 6: L-Cystin (2)

p_H 7: L-Arginin

Gemischte Typen

p_H 5: Cystin, Adenin (H)$^{)+}$; Cystin + Adenin, Guanin; Tyr, Cystin (H), Ser (H); Cystin + Met, Gly (H), Ile (H); Met, Leu, Ile, Val (H); Cystin, Met, Ser, Glu (H), Gln (H); Cystin, Met, Thiamin + Adenin, Asp (H), Asn (H), Guanin (H); Met, Lys, Adenin, Arg, Cystin (H), Leu (H), Tyr (H); Ser, p-Aminobenzoesäure, Folsäure, Thr (H), Asn (H), Adenin (H), Guanin (H)

p_H 6: Adenin, Tyr (H); Guanin, Adenin (H); Thr, Asp (H), Asn (H); Tyr + Phe, Guanin; Leu, Ile, Val, Thr (H); Ile, Val, Tyr, Thiamin, Phe (H); Leu + Ile, Ile + Val, Val + Thr, Phe (H)

p_H 7: Met, Cystin (H); Trp, Phe (H); Cystin, Met, Adenin (H) (2); Cystin + Thr, Met + Thr; Cystin + Adenin, Met + Adenin; Adenin + Guanin, Adenin + His; Met, Phe, Trp, Thiamin, Tyr (H); Lys, L-Cystin (H), Ser (H), Leu (H), Val (H); Met + Ile, Met + Thr, Met + Arg; Met, Ser, Glu, Gln, Asp (H), Adenin (H), Arg (H); Met, Gly, Nicotinsäureamid, Pro, Cystin (H), Adenin (H), Guanin (H); Lys, Tyr, Phe, Glu, Gln, Asp, Cystin (H), Adenin (H), Guanin (H)

5.3. Methylierungsversuche mit NNMG in Gegenwart von Sulfhydrylverbindungen

Versuche mit ^{3}H-Methyl-NNMG

0,7 ml ca. 0,08 m Puffer (L 2) verschiedener p_H-Werte enthielten folgendes Reaktionsgemisch:

500 γ DNS oder tRNS
300 γ ^{3}H-Methyl-NNMG (2 µMol) und bis zu
10 µMol Cysteinhydrochlorid, Methionin oder
ß-Mercaptoäthanol

$)^+$ (H): Die vorstehende Substanz bewirkt eine Wachstumshemmung

Die Proben wurden bei 37° geschüttelt. Danach erfolgte die Reinigung der Nucleinsäuren durch 8 bis 12 Stunden lange Dialyse bei 4° gegen deion. Wasser.

Versuche mit ^{14}C-Methyl-NNMG

Die Versuche wurden mit und ohne Cystein bei gleichen Bedingungen und Mengenverhältnissen wie die mit ^{3}H-Methyl-NNMG durchgeführt. Die Proben enthielten jedoch 70γ ^{14}C-Methyl-NNMG (0,5 µMol). Folgende Ergebnisse dienten u.a. als Grundlage für Abb. 15:

Die Methylierung der DNS in vitro mit ^{14}C-Methyl-NNMG in Abhängigkeit vom p_H-Wert nach 5stündiger Reaktion

	ohne Cystein		mit 3,3 µMol Cystein	
p_H	in Ip20M/mg DNS	in %	in Ip20M/mg DNS	in %
5	9268	60,4	43654	76,4
6	15379	100	57186	100
7	61160	398	51813	90,6

5.4. Versuche zur Umsetzung von Cystein mit NNMG

In einem Dreihalskolben wurden in 150 ml m/30 Phosphatpuffer nach Sörensen (vgl. 2.2.) 588 mg (4 mMol) NNMG bei 37° unter Rühren gelöst und dann in 10 ml Wasser gelöste 485 mg (4 mMol) Cystein tropfenweise unter Rühren zugegeben. Die Stickstoffentwicklung wurde in einer Bürette gemessen. Nach 40 Minuten war die Reaktionslösung gelb gefärbt und die Stickstoffentwicklung nur noch schwach. Nach Zugabe von 121 mg (1 mMol) Cystein entfärbte sich die Reaktionslösung. Ein ähnlicher Verlauf der Gasentwicklung war unter den gleichen Bedingungen mit ß-Mercaptoäthanol zu beobachten. Nach 12 Minuten war die Lösung gelb gefärbt und die Gasentwicklung fast beendet.

Unter den zahlreichen Reaktionsprodukten wurde S-Methylcystein papierchromatographisch durch Vergleich mit authentischer Substanz nachgewiesen. Ein Besprühen mit Ninhydrin-Reagens zeigte eine Violettfärbung.

Chromatographiesysteme (173)

Chromatographie aufsteigend an Chromatographiepapier MN 214 ff der Firma Macherey und Nagel

S 7: p-Kresol-Wasser-2 n Ammoniak (Atm.) (1 : 1 g/g)
(Zusatz einer Spur Oxin)

S 8: Phenol (wasserges.) - 2 n Ammoniak (Atm.) (775 : 225 g/g)

s 9: n-Butanol-Ameisensäure-Wasser (75 : 15 : 10)

Substanz	R_F-Werte in den Laufsystemen		
	S 6	S 7	S 8
Cystein	0,16	0,41/0,68	0,26/0,14/0,67
S-Methylcystein	0,53	0,74	0,42

Ninhydrin-Reagens (173)

0,3 g Ninhydrin wurden in 55 ml Methanol gelöst und mit 5 ml Collidin versetzt. Die besprühten Flecken wurden 30 Minuten bei 80° entwickelt.

S-Methylcystein konnte auch durch Analyse des Reaktionsgemisches im Aminosäurenanalysator nachgewiesen werden. Als weiteres Produkt wurde eine in Wasser schwerlösliche, in Salzsäure und Kalilauge leicht lösliche Ninhydrin-positive Substanz gefunden, die im Aminosäurenanalysator als Cystin (F_p 225°) identifiziert wurde. Auf die gleiche Weise wurde Cysteinsäure festgestellt.

5.5. Abschätzung der Methylierung der Nucleotide in vivo

Legt man als durchschnittliches Molekulargewicht der Nucleotide $3{,}4 \cdot 10^2$ zugrunde, erhält man unter Verwendung der Loschmidtschen Zahl $N = 6{,}02 \cdot 10^{23}$ für 1 mg DNS

$$\frac{6{,}0 \cdot 10^{20}}{3{,}4 \cdot 10^2} = 1{,}8 \cdot 10^{18} \text{ Nucleotide}$$

1 mg DNS zeigte nach 2stündiger Inkubation der E. coli-Bakterien mit 20 γ ^{3}H-Methyl-NNMG/ml die Aktivität $2{,}0 \cdot 10^3$ Ip2OM $\hat{=}$ $1{,}0 \cdot 10^2$ IpM (Theoret. Teil 3.5.), d.h. bei 22,5% Zählausbeute für Tritium $4{,}5 \cdot 10^2$ Zerf./Min. bzw., da $2{,}2 \cdot 10^6$ Zerf./Min. = 1 µC, $2{,}0 \cdot 10^{-4}$ µC. Da 1 mg DNS ca. $1{,}8 \cdot 10^{18}$ Nucleotide enthält, folgt somit

$$\frac{2{,}0 \cdot 10^{-4} \text{ µC}}{1{,}8 \cdot 10^{18} \text{ Nucleotide}} = 1{,}1 \cdot 10^{-22} \frac{\text{µC}}{\text{Nucleotid}} \qquad (1)$$

Die spez. Aktivität des ^{3}H-Methyl-NNMG beträgt 180 µC/mMol. Da 1 mMol NNMG $6{,}0 \cdot 10^{20}$ Methylgruppen besitzt, gilt

$$\frac{180 \text{ µC}}{6{,}0 \cdot 10^{20} \text{ Methylgr.}} = 3{,}0 \cdot 10^{-19} \frac{\text{µC}}{\text{Methylgr.}} \qquad (2)$$

Aus (1) und (2) folgt also

$$\frac{1{,}1 \cdot 10^{-22} \text{ µC/Nucleotid}}{3{,}0 \cdot 10^{-19} \text{ µC/Methylgr.}} = 3{,}7 \cdot 10^{-4} \frac{\text{Methylgr.}}{\text{Nucleotid}},$$

d.h. 0,037% der DNS-Nucleotide tragen eine Methylgruppe. Sind 70% der methylierten Nucleotide wie bei der RNS Guanylsäure (Theoret. Teil 3.2.1.), besitzt die DNS 0,026% methylierte Guanylsäuremoleküle. Bei dieser Abschätzung ist eine Metabolisierung der Methylgruppen unberücksichtigt geblieben.

Zusammenfassung

1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) wirkt mutagen. Es zeigt bei geringer Inaktivierung eine hohe Mutationsrate mit einem Optimum bei p_H 5,5 - 6,0. Chemische Untersuchungen hatten ergeben, daß NNMG in stark alkalischem Bereich Diazomethan und unter sauren Bedingungen salpetrige Säure bildet. Da im p_H-Bereich optimaler Mutationsrate die geringste chemische Reaktivität vorzuliegen scheint, ist der Wirkungsmechanismus des Mutagens schwer zu deuten.

Zunächst wurden die Beziehungen zwischen Stabilität des Mutagens, Mutationsauslösung, Inaktivierung, NNMG-Aufnahme und Wachstumshemmung in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei E. coli B geklärt. Mit einer Halbwertszeit von 40 Stunden erwies sich NNMG bei 37° bei p_H 5 am stabilsten, während bei p_H 6 schon in 14,4 Stunden die Hälfte des Mutagens zerfallen ist. Nach 2stündiger Einwirkung von 20γ NNMG/ml entsprach geringste Abtötung der Bakterien größter Stabilität des NNMG im sauren Bereich. Nach 5stündiger Einwirkung des Mutagens war bei annähernd gleich starker Abtötung ein Mutationsoptimum bei p_H 6,0/6,5 zu beobachten, und NNMG-Aufnahme und Mutationsrate verliefen weitgehend gleichsinnig. Entsprechende Ergebnisse wurden mit der roten Mutante von Saccharomyces cerevisiae E 188 ad^- erzielt. Bacillus subtilis B 23 dagegen zeigte ein Optimum der NNMG-Aufnahme bei p_H 7,5. Im Komplettmedium ließen sich bei p_H 6 mit E. coli sowohl stärkste Wachstumshemmung als auch größte NNMG-Aufnahme nachweisen.

Zur Erforschung der Wirkungsweise von NNMG auf Nucleinsäuren wurde die Veränderung der Matrizenaktivität künstlicher Polyribonucleotide nach Einwirkung von NNMG bei p_H 5,5 und 37° mit Hilfe der zellfreien Proteinbiosynthese untersucht. Dabei zeigten sich Matrizeninaktivierungen mit zunehmender Stärke in der Reihe Poly-U, Poly-A und Poly-C. Um die Rolle

des Guanins bzw. der Guanylsäure zu klären, wurden Experimente mit Poly-AG sowie Untersuchungen der Transfer- und auch der Akzeptoraktivität NNMG-behandelter Transfer-RNS durchgeführt. Hierbei wurde der Einbau solcher Aminosauren am stärksten gehemmt, die G-haltige Anticodons erfordern. Die Inaktivierung der Polynucleotide durch NNMG stieg entsprechend ihrer Nucleobasen in der Reihe Uracil, Adenin, Cytosin und Guanin an. Aus dem vermehrten Einbau der Glutaminsäure bei Poly-A wurde auf eine Code-Änderung $AA_G^A \rightarrow GA_G^A$ geschlossen, die mit der Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin zu erklären ist. Bei der Polyuridylsäure wurde ein vermehrter Leucineinbau gefunden. Eine Untersuchung der Matrizenaktivität NNMG-behandelter DNS im RNS synthetisierenden Polymerasesystem ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Einbauraten von CMP und AMP. Mit Hilfe von ^{3}H-Methyl-NNMG wurde festgestellt, daß der Inaktivierung der Matrizenfunktion der DNS eine Methylierung der DNS entspricht.

weiterhin wurde die direkte Einwirkung von NNMG auf Polyribonucleotide, RNS und DNS untersucht. Dabei zeigte sich, daß zunehmender Inaktivierung der Polynucleotide in der Reihe ihrer Basen U, A, C und G eine zunehmende Methylierungsrate entspricht. Guanin weist mit ca. 70% die stärkste Methylierung aller Nucleobasen auf. Die Methylierungsrate der DNS und RNS wächst mit steigendem p_H-Wert an. Zur Feststellung der Methylierungsprodukte wurden Adenin und Cytosin sowie künstliche Polyribonucleotide mit ^{14}C-Methyl-NNMG bei 37° und p_H 6 umgesetzt. Dabei entstanden aus Adenin und in Poly-A 1- und 3-Methyladenin sowie N^6-Methyladenin. Aus Cytosin wurden 1- und 3-Methylcytosin und aus Poly-C 1-Methylcytosin erhalten. In Poly-UG konnte nach der Umsetzung 7-Methylguanin nachgewiesen werden.

Bei E. coli wurde anhand des Einbaus von ^{3}H-Uracil im Komplettmedium in Gegenwart von NNMG nach zwei und fünf Stunden eine Hemmung der Nucleinsäuresynthesen festgestellt. Die Synthese der DNS wurde stärker als die der RNS gehemmt. Extrakte von im Komplettmedium unter NNMG-Zusatz gezüchteten E. coli-Bakterien zeigten eine Hemmung der Proteinbiosynthese. Sie konnte auf eine Inaktivierung der Ribosomen zurückgeführt werden. Ribo-

somen-RNS, die aus ^{3}H-Methyl-NNMG-behandelten Bakterien isoliert wurde, ließ Zerstörungen und Methylierungen der leichteren rRNS-Fraktionen eines Saccharose-Gradienten erkennen. Eine Untersuchung NNMG-resistenter Bakterienpopulationen ergab, daß Wachstumshemmungen, Verringerung der Mutationsrate und der Abtötung einer Verminderung der NNMG-Aufnahme entsprechen. Die Resistenzausbildung kann daher mit einer verringerten NNMG-Aufnahme erklärt werden.

Zur Feststellung der Methylierungsstärke der Nucleinsäuren in vivo wurden E. coli-Bakterien mit ^{3}H-Methyl-NNMG bzw. ^{14}C-Methyl-NNMG bei p_H 6 bzw. bei p_H 5, 6 und 7 inkubiert. Die Analyse des Bakterienextraktes im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten ließ Markierungen der Nucleinsäuren und des Proteins erkennen. Dabei zeigte sich, daß die DNS in vivo eine viel größere Methylierungsrate und mit einem Methylierungsoptimum bei p_H 6 eine andere p_H-Abhängigkeit der Methylierung als in vitro aufweist. Die aus der Markierung ermittelte Methylierung der Guanylsäure bzw. des Guanins stimmt mit 0,025% in der Größenordnung mit der anderer Agenzien überein, die in Organismen Guanin methylieren. Mutations- und Methylierungsrate der DNS sind bei p_H 6 und 7 einander proportional. Die Unterschiede zwischen den Methylierungen in vivo und in vitro ließen erkennen, daß mit der einfachen Reaktion der DNS mit NNMG der Mutationsvorgang nicht erklärt werden kann. In Gegenwart von Cystein jedoch wurde nach 5stündiger Einwirkung von ^{3}H-Methyl-NNMG oder ^{14}C-Methyl-NNMG auf die DNS bei 37° ein Methylierungsoptimum bei p_H 6 mit 5facher Methylierungsrate erhalten. tRNS zeigte nach einer Stunde eine 20fache Methylierungsrate gegenüber einem Cystein-freien Ansatz. Diese verstärkte Methylierung war auch mit ß-Mercaptoäthanol festzustellen, so daß sie offenbar allgemein für Sulfhydrylverbindungen gilt. Mit Methionin war keine solche Steigerung der Methylierungsrate zu beobachten.

Literaturverzeichnis

1. G. Heberer u. F. Schwantz, Hundert Jahre Evolution, Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1960
2. R. Acher, Angew. Chem. 78, 856 (1966)
3. H. Hellmann u. F. Lingens, Angew. Chem. 73, 107 (1961)
4. J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature (London) 171, 737 (1953)
5. E. Schrödinger, Was ist Leben? Leo Lehnen Verlag GmbH München 1951; Titel des Originals: What is Life? Cambridge University Press 1944
6. C. Auerbach u. J. M. Robson, Nature (London) 157, 302 (1946)
7. L. S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 49, 94 (1963)
8. P. D. Lawley, The Molecular Basis of Neoplasia, University of Texas Press, Austin, Texas S. 123 (1962)
9. P. D. Lawley u. P. Brookes, A. R. Brit. Empire Cancer Compaign 37, 68 (1959)
10. K. W. Kohn u. C. L. Spears, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 145, 720 (1967)
11. O. J. R. Laurence, Proc. Roy. Soc. (London) A 271, 520 (1963)
12. E. A. Löbbecke, Genetics 48, 691 (1963)
13. E. Freese, J. Mol. Biol. 1, 87 (1959)
14. H. Schuster u. G. Schramm, Z. Naturforsch. 13b, 697 (1958)
15. H. Schuster, Z. Naturforsch. 15b, 198 (1960)
16. D. W. Verwoerd, W. Zillig u. H. Kohlhage, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 332, 184 (1963)
17. F. Lingens, Z. Naturforsch. 19b, 151 (1964)
18. S. Takemura u. M. Miyazaki, Bull. Chem. Soc. Japan 32, 926 (1959)
19. S. Takemura, Bull. Chem. Soc. Japan 32, 920 (1959)

20. S. Fosse, A. Hieulle u. L. W. Bass, C. R. Acad. Sci. (Paris) 178, 811 (1924)
21. F. Lingens u. H. Schneider-Bernlöhr, Liebigs Ann. Chem. 686, 134 (1965)
22. G. P. Warwick, Cancer Res. 23, 1315 (1963)
23. A. Loveless u. S. Howarth, Nature (London) 184, 1780 (1959)
24. F. Lingens u. O. Oltmanns, Z. Naturforsch. 19b, 1058 (1964)
25. G. P. Wheeler, Cancer Res. 22, 651 (1962)
26. A. J. Müller u. T. Gichner, Nature (London) 201, 1149 (1964)
27. A. F. McKay u. G. F. Wright, J. Amer. Chem. Soc. 69, 3028 (1947)
28. A. F. McKay, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1968 (1949)
29. A. F. McKay, J. Amer. Chem. Soc. 70, 1974 (1948)
30. F. Arndt, B. Eistert u. W. Walter, Naturwissenschaften 50, 379 (1963)
31. J. H. Bryden, L. A. Burkardt u. E. W. Hughes, Acta Crystall. 9, 573 (1956)
32. A. Eisenstark, R. Eisenstark u. R. v. Sickle, Mutation Res. 2, 1 (1965)
33. J. Takahashi u. R. A. Barnard, Mutation Res. 4, 111 (1967)
34. H. Druckrey, K. Preussmann, S. Ivankovic, B. T. So, C. H. Schmidt u. J. Bücheler, Z. Krebsforsch. 68, 87 (1966)
35. H. v. Pechmann, Chem. Ber. 28, 855 (1895)
36. T. Sugimura, M. Nagao u. Y. Okada, Nature (London) 210, 962 (1966)
37. A. Goldin, J. M. Venditti u. J. Kline, Cancer Res. 19, CS 429 (1959)
38. W. A. Skinner, H. F. Gram, O. M. Green, J. Greenberg u. B. Baker, J. med. pharmac. Chem. 2, 229 (1960)
39. O. M. Green u. J. Greenberg, Cancer Res. 20, 1166 (1960)
40. J. D. Mandell u. J. Greenberg, Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 575 (1960)
41. A. Terawaki u. J. Greenberg, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam), 95, 170 (1965)
42. C. v. Baalen, Science (Washington) 149, 70 (1965)

43. F. Lingens u. O. Oltmanns, Z. Naturforsch. 21b, 660 (1966)
44. R. Schwaier, Z. Vererbungslehre 97, 55 (1965)
45. H. V. Malling u. F. J. DeSerres, Genetics (Abstract) 56, 575 (1967)
46. D. R. McCalla, Science (Washington), 148, 497 (1965)
47. N. W. Gillham, Genetics 52, 529 (1965)
48. T. Gichner, A. Michaelis u. R. Rieger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 120 (1963)
49. H. Fraenkel-Conrat, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 49, 169 (1961)
50. R. Loppes, Z. Vererbungslehre 98, 193 (1966)
51. H. Marquardt, F. K. Zimmermann u. R. Schwaier, Z. Vererbungslehre 95, 82 (1964)
52. E. A. Adelberg, M. Mandel u. G. Chein Ching Chen, Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788 (1965)
53. R. Süßmuth u. F. Lingens, Naturwissenschaften 55, 85 (1968)
54. R. Schwaier, Freiburg, persönliche Mitteilung
55. F. K. Zimmermann, R. Schwaier u. U. v. Laer, Z. Vererbungslehre 97, 68 (1965)
56. M. W. Nirenberg u. J. H. Matthaei, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (Washington) 47, 1588 (1961)
57. E. Harbers, Die Nucleinsäuren, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1964
58. C. Bresch, Klassische und molekulare Genetik, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1965
59. H. R. Mahler u. E. H. Cordes, Biological Chemistry, Harper & Row, New York 1967
60. Nature (London) 214, 759 (1967)
61. L. Astrachan u. E. Volkin, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 29, 536 (1958)
62. J. H. Matthaei, O. W. Jones, R. G. Martin u. M. W. Nirenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 48, 666 (1962)
63. W. M. Stanley, M. Salas, A. J. Wahba u. S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 56, 290 (1966)
64. R. Brimacombe, J. Trupin, M. W. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield u. T. Jaouni, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 54, 954 (1965)

65. D. Söll, E. Ohtsuka, D. S. Jones, R. Lohrmann, H. Hayatsu, S. Nishimura u. H. Khorana, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 54, 1378 (1965)
66. S. Brenner, A. O. W. Stretton u. S. Kaplan, Nature (London) 206, 994 (1965)
67. S. Brenner, L. Barnett, E. R. Katz u. F. H. C. Crick, Nature (London) 213, 449 (1967)
68. R. E. Marshall, C. T. Caskey u. M. Nirenberg, Science (Washington) 155, 820 (1967)
69. F. H. Crick, J. Mol. Biol. 19, 548 (1966)
70. W. Fuller u. A. Hodgson, Nature (London) 215, 817 (1967)
71. P. Chandra u. A. Wacker, Biophysik 3, 224 (1966)
72. J. D. Watson, Angew. Chem. 75, 439 (1963)
73. H. Noll, T. Staehelin u. F. O. Wettstein, Nature (London) 198, 632 (1963)
74. B. F. C. Clark u. K. A. Marcker, J. Mol. Biol. 17, 394 (1966)
75. M. Salas, M. B. Hille, J. A. Last, A. Wahba u. S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 57, 387 (1967)
76. E. Bautz-Freese, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 47, 540 (1961)
77. C. W. Abell, L. A. Rosini u. M. R. Ramseur, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 54, 608 (1965)
78. P. Chandra, A. Wacker, R. Süßmuth u. F. Lingens, Z. Naturforsch. 22b, 512 (1967)
79. H. B. Singer u. H. Fraenkel-Conrat, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 58, 234 (1967)
80. W. Vielmetter u. H. Schuster, Z. Naturforsch. 15b, 304 (1960)
81. A. Kornberg, Science 131, 1503 (1960)
82. J. Hurwitz, A. Bresler u. R. Diringer, Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 15 (1960)
83. S. B. Weiss u. T. Nakamoto, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 47, 694 (1961)
84. R. C. Warner, H. H. Samuels, M. T. Abbott u. J. S. Krakow, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 49, 533 (1963)
85. M. Hayashi, M. N. Hayashi u. S. Spiegelman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 50, 664 (1963)

86. F. Lingens, R. Süßmuth, A. Wacker u. P. Chandra, Naturwissenschaften 54, 492 (1967)
87. D. R. McCalla, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 155, 114 (1968)
88. F. Lingens u. J. Rau, unveröffentlicht
89. C. Basilio, A. J. Wahba, P. Lengyel, J. F. Speyer u. S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 48, 613 (1961)
90. R. M. Litman, J. Chim. Phys. 58, 997 (1961)
91. M. J. Bessman, I. R. Lehman, J. Adler, S. B. Zimmermann, E. S. Simms u. A. Kornberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 44, 633 (1958)
92. H. G. Wittmann, Z. Vererbungslehre 93, 491 (1962)
93. R. C. Wilhelm u. D. B. Ludlum, Science 153, 1403 (1966)
94. B. Reiner u. S. Zamenhof, J. biol. Chemistry 228, 475 (1957)
95. P. Alexander, J. T. Lett u. G. Parkins, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 48, 423 (1961)
96. E. Freese, In Taylor, Molec. Genetics, Acad. Press, New York u. London 207, 1963
97. P. D. Lawley u. P. Brookes, Biochem. J. 89, 127 (1963)
98. J. Rau u. F. Lingens, Naturwissenschaften 54, 517 (1967)
99. E. Kriek u. P. Emmelot, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 91, 59 (1964)
100. P. N. Magee u. E. Farber, Biochem. J. 83, 114 (1962)
101. D. F. Heath, Biochem. J. 85, 72 (1962)
102. Patent der Schering-Kahlbaum AG, Erfinder H. Meerwein, Chem. Zentralblatt 1933 II 1758 (1933)
103. E. Müller, H. Haiss u. W. Rundel, Chem. Ber. 93, 1541 (1960)
104. R. A. Henry, J. Amer. Chem. Soc. 72, 3287 (1950)
105. A. T. Austin, Nature (London) 188, 1086 (1960)
106. W. Kirmse u. G. Wächtershäuser, Liebigs Ann. Chem. 707, 44 (1967)
107. P. Emmelot, I. J. Mizrahi u. E. Kriek, Nature (London) 193, 1158 (1962)
108. M. Friedkin u. DeWayne Roberts, J. biol. Chemistry 207, 245 (1954)

109. M. Friedkin u. DeWayne Roberts, J. biol. Chemistry 207, 257 (1954)
110. E. C. Cox, J. R. White u. J. G. Flaks, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 703 (1964)
111. E. Kriek u. P. Emmelot, Biochemistry (A.C.S.) 2, 733 (1963)
112. P. Brookes u. P. D. Lawley, Biochem. J. 80, 496 (1961)
113. I. Hirono, Japan, J. Cancer Res. (Gann) 53, 73 (1962)
114. A. Marquardt, R. Schwaier u. F. Zimmermann, Naturwissenschaften 50, 135 (1963)
115. H. Herrmann, Naturwissenschaften 47, 162 (1960)
116. H. Beckmann u. R. W. Kaplan, Z. Allgem. Mikrobiol. 5, 1 (1965)
117. K. Moebus, Dissertation, Tübingen 1966
118. A. J. Therkelsen, Biochem. Pharmacol. 1, 245 (1958)
119. P. Emmelot u. I. J. Mizrahi, Nature (London) 192, 42 (1961)
120. E. L. Brandt u. A. C. Griffin, Cancer 4, 1030 (1951)
121. R. Schoental, Nature (London) 209, 148 (1966)
122. R. Schoental, Biochem. J. 102, 5c (1967)
123. J. Greenberg u. J. Morris, Antibiotics & Chemotherapy 11, 52 (1961)
124. H. A. Harper, Review of Physiological Chemistry, Los Altos California 1967
125. D. B. Dunn, Biochem. J. 86, 14p (1963)
126. N. Sarkar u. D. G. Comb, J. Mol. Biol. 17, 541 (1966)
127. R. Wyatt, Biochem. J. 48, 584 (1951)
128. D. B. Dunn u. J. D. Smith, Biochem. J. 68, 627 (1958)
129. P. R. Srinivasan u. E. Borek, Science (Washington) 145, 548 (1964)
130. L. R. Mandel u. E. Borek, Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 138 (1961)
131. B. B. Biswas, M. Edmonds u. R. Abrams, Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 146 (1961)
132. P. N. Magee u. K. Y. Lee, Biochem. J. 91, 35 (1964)
133. J. Bremer u. Y. Natori, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 44, 367 (1960)

134. S. K. Shapiro, D. A. Yphantis u. A. Almenas, J. biol. Chemistry 239, 1551 (1964)
135. F. Schlenk in Fortschritte d. Chemie org. Naturstoffe XXIII, Herausgeber: L. Zechmeister, Springer-Verlag, Wien - New York, S. 63 (1965)
136. J. Durell u. G. L. Cantoni, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 35, 515 (1959)
137. F. Challenger, R. Bywood, P. Thomas u. B. J. Hayward, Arch. Biochem. Biophysics 69, 514 (1957)
138. R. Schoental u. D. J. Rive, Biochem. J. 87, 22p (1963)
139. R. Schoental u. D. J. Rive, Biochem. J. 97, 466 (1965)
140. A. M. Ryan u. E. Borek, Federation Proc. 23, 374 (1964)
141. P. F. Swann, Nature (London) 214, 918 (1967)
142. B. D. Howard u. I. Tessman, J. Mol. Biol. 9, 364 (1964)
143. D. R. Krieg, Genetics 48, 561 (1963)
144. D. Shugar u. W. Szer, J. Mol. Biol. 5, 580 (1962)
145. A. M. Michelson u. F. Pochon, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 114, 469 (1966)
146. A. M. Michelson u. M. Grunberg-Manago, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 91, 92 (1964)
147. P. Brookes u. P. D. Lawley, J. Cell. u. Comp. Physiol. 1, 111 (1964)
148. J. P. Scannell, A. M. Cresterfield u. F. W. Allen, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 32, 406 (1959)
149. C. Tamm, M. E. Hodes u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 195, 49 (1952)
150. S. Brenner, L. Barnett, F. H. C. Crick u. A. Orgel, J. Mol. Biol. 3, 121 (1961)
151. H. J. Whitfield, R. G. Martin u. B. N. Ames, J. Mol. Biol. 21, 335 (1966)
152. B. S. Strauss u. R. Wahl, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 80, 116 (1964)
153. R. Holliday, Mutation Res. 4, 275 (1967)
154. P. Howard-Flanders u. R. P. Boyce, Genetics 50, 256 (1964)
155. E. Cerdá-Olmedo u. P. C. Hanawalt, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 142, 450 (1967)

156. J. D. Mandell, P. L. Woody u. J. Greenberg, J. Bacteriol. 81, 419 (1961)
157. H. Malke, Z. Naturforsch. 22b, 1139 (1967)
158. A. L. Goldberg u. R. E. Wittes, Science (Washington) 153, 420 (1966)
159. J. Marmur u. P. Doty, J. Mol. Biol. 5, 109 (1962)
160. S. R. Pelc, Nature (London) 207, 597 (1965)
161. M. V. Volkenstein, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 119, 421 (1966)
162. C. Tanford, J. Amer. Chem. Soc. 84, 4240 (1962)
163. P. v. Sengbusch, Naturwissenschaften 54, 267 (1967)
164. F. Kaudewitz, Z. Naturforsch. 14b, 528 (1959)
165. W. Zillig, E. Fuchs u. R. Millete in Proc. Nucl. Acid Res., Herausgeber: Cantoni u. Davies, Harper & Row, London, S. 323, 1966
166. H. M. Rauen (Herausgeber), Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg - New York 1964
167. H. Getoff, Kurzes radiochemisches Praktikum, Franz Deuticke, Wien 1961
168. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951)
169. R. J. Mans u. G. D. Novelli, Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 540 (1960)
170. G. v. Ehrenstein u. D. Dais, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. (Washington) 50, 81 (1963)
171. B. Keil u. Z. Sormova, Laboratoriumstechnik für Biochemiker, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.G., Leipzig 1965
172. G. P. Georgiev u. V. L. Mantieva, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 61, 153 (1962)
173. I. M. Hais u. K. Maček, Handbuch der Papierchromatographie, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958

Lebenslauf

Am 16. April 1934 wurde ich als Sohn des Rektors Berthold Süssmuth und seiner Ehefrau Rosa, einer geborenen Hohaus, in Mittelsteine (Niederschlesien) geboren.

In Breslau und nach Evakuierung in Obersteine besuchte ich bis 1944 die Volksschule und war noch kurze Zeit Schüler des Breslauer Elisabet-Gymnasiums. Als wir 1945 Schlesien verlassen mussten, wurden wir als deutsche Staatsangehörige in mehreren Lagern in der Tschechoslowakei festgehalten. Dort starb 1946 mein Vater. Nach fast zweijähriger Unterbrechung setzte ich den Besuch der Oberschule in Wolgast (Vorpommern) bis 1952 fort. 1953 wurde ich Schüler des Gymnasiums Hechingen und legte 1955 das Abitur ab. Anschliessend begann ich das Studium der Naturwissenschaften und der Philosophie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und fertigte 1961/62 bei Herrn Doz. Dr. Lingens eine Arbeit "Über die Hydroxylierung der Anthranilsäure, der Hydroxyanthranilsäuren und der 3-Aminophthalsäure" an. 1962 legte ich das Philosophikum ab und bestand im Frühjahr 1964 das Staatsexamen vor dem Prüfungsamt Stuttgart/Tübingen. 1964/65 war ich als Vertragslehrer am Gymnasium Ebingen und als Referendar an den Gymnasien Horb, Wildermuth-Gymnasium Tübingen und Kepler-Gymnasium Reutlingen tätig. Ende 1965 bestand ich die Pädagogische Dienstprüfung mit einer Arbeit "Molekulargenetik in der Oberstufe" in Tübingen.

Seit Beginn des Jahres 1966 bis Anfang 1968 arbeitete ich an der Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Lingens am Chemischen Institut der Universität Tübingen.

Für die naturwissenschaftliche Ausbildung danke ich den Hochschullehrern

in Chemie:

E. Bayer, K. Brodersen, H. Hellmann, G. Kortüm, F. Lingens, E. Müller, G. Opitz, W. Rüdorff und G. Wittig,

in Botanik, Zoologie, Genetik und Mikrobiologie:

L. Bauer, E. Bünning, K. G. Grell, B. Hassenstein, K. Kaudewitz, K. Mägdefrau, F. P. Möhres, H. Peters, H. Risler, O. Wilmanns, H. Zähner und W. Zimmermann,

in Physik und Mathematik:

W. Braunbek, H. Krüger, G. Pickert, G. Möllenstedt, R. Mühleisen und W. Schweizer,

in Mineralogie/Geologie:

A. Eisenack, S. Haussühl, R. Schönenberg und K. Spangenberg.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG · Markusplatz 22 · Tel.: 0951/6 27 94